

**Darstellung und Charakterisierung
neuartiger, chiraler, basischer Benzilsäureester
mit anticholinerger Wirkung**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Pharmazie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Jana Selent

geboren am 2. Juli 1973 in Treuenbrietzen

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Thomas Buckhout, PhD

1. Gutachter: Prof. Dr. Berthold Göber

2. Gutachter: PD Dr. habil. Wolfgang Brandt

Tag der mündlichen Prüfung: 19. November 2004

Die vorliegende Dissertation entstand am Institut für Pharmazie und Institut für Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. B. Göber, dem ich für die Überlassung des interessanten Themas, die gute Betreuung und die wertvollen Diskussionen herzlich danke.

Herrn Prof. Dr. J. Liebscher danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Möglichkeit nach der Schließung des Institutes für Pharmazie weiterhin experimentell arbeiten zu können.

Der Apogepha Arzneimittel GmbH Dresden danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Mein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern des Institutes für Chemie der Humboldt-Universität, insbesondere Herrn Dr. M. von Löwis of Menar und Frau A. Woyda für die Aufnahme der Massenspektren, Frau A. Thiesies für die Aufnahme der Kernresonanzspektren sowie Herrn Dr. U. Hartmann und Mitarbeitern für die Durchführung der Elementaranalysen. Herrn Dr. B. Ziemer und Frau P. Neubauer danke ich für die Anfertigung der Röntgenkristallstrukturanalysen.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. habil. W. Brandt, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (Halle) für seine wertvolle Unterstützung bei der Durchführung der Molecular Modelling Berechnungen.

Allen ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazie der Humboldt-Universität, insbesondere den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie, möchte ich für die Unterstützung beim Zustandekommen dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. H. Brosig und Dr. M. Bierwisch für die immer gewährte Unterstützung bei chemischen Fragestellungen sowie L. Wagner für ihre unerschöpfliche redaktionelle Mithilfe.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Substanzbezeichnungen (Teil 1)	8
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	9
Abbildungsverzeichnis	11
Tabellenverzeichnis	13
Verzeichnis der Schemata	15
Diagrammverzeichnis	16
1 Einleitung und Problemstellung	17
2 Theoretischer Teil	20
2.1 Die Leitstruktur N-Methyl-4-piperidyl benzilat und verwandte Verbindungen mit anticholinerger Wirkung	20
2.2 Stereoselektive Darstellung chiraler α -Hydroxyester – eine Literaturübersicht	22
2.2.1 Allgemein	22
2.2.2 PRELOG-Regel	24
2.2.3 Chirale α -Ketooxazoline	24
2.2.4 Vicinale <i>cis</i> -Aminoindanole	26
2.2.5 (-)-Menthyl phenylglyoxylate	27
2.2.6 (-)-8-Phenylmenthol als chirales Auxiliar	29
2.2.7 Derivate des (-)-8-Phenylmenthol	30
2.2.8 Zusammenfassung	31
3 Untersuchungen und Ergebnisse	32
3.1 Systematische Untersuchung der Darstellung von optisch aktiven Benzilsäureestern	32
3.1.1 Einleitung	32
	3

3.1.2	Untersuchungen zur Synthese	32
3.1.2.1	Synthese der Vorstufen	33
3.1.2.2	Stereoselektive Addition des GRIGNARD-Reagenzes	37
3.1.2.3	Darstellung der enantiomeren Zielstrukturen	42
3.1.2.4	Darstellung racemischer N-Methyl-4-piperidyl benzilate	43
3.1.2.5	Diskussion	44
3.1.3	Kristallisationsmethoden	46
3.1.3.1	Trennung der Enantiomere durch physikalische Methoden	46
3.1.3.2	Chemische Trennung der Enantiomere über Diastereomere	51
3.1.3.3	Diskussion	54
3.1.4	Chromatographische Methoden	58
3.1.4.1	Direkte Racemattrennung an chiralen stationären Phasen	59
3.1.4.2	Indirekte Racemattrennung an achiraler stationärer Phase	64
3.1.4.3	Diskussion	66
3.1.5	Enzymatische Umsetzung	68
3.1.5.1	Vorversuche - Enzymscreening	69
3.1.5.2	Enantioselektivität der enzymatischen Reaktion	71
3.1.5.3	Diskussion	72
3.2	Analytische Charakterisierung	75
3.2.1	Polarimetrie	75
3.2.2	Circulardichroismus (CD) und Optische Rotationsdispersion (ORD)	77
3.2.3	Kernresonanzspektroskopie	79
3.2.4	Kapillarelektrophorese	82
3.2.5	Röntgenkristallstrukturanalyse	83

3.2.6	Diskussion	88
3.3	Stabilitätsuntersuchungen: Racemisierung/Epimerisierung	89
3.3.1	Stabilität in wässriger Lösung	89
3.3.2	Stabilität von N-Methyl-4-piperidyl-, (-)-Menthyl- und (-)-8-Phenyl-menthyl benzilaten im schwefelsauren Milieu	90
3.3.3	Diskussion	92
3.4	Radioligand-Bindungsstudien an Muscarinrezeptorsubtypen	95
3.4.1	Untersuchungen	95
3.4.2	Diskussion	99
3.5	Molecular Modelling	103
3.5.1	Einleitung	103
3.5.2	Methoden	106
3.5.2.1	Modelling der Rezeptoren	106
3.5.2.2	Dockingstudien	107
3.5.2.3	Energieoptimierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes	107
3.5.3	Ergebnisse	108
3.5.3.1	Qualitative Auswertung	108
3.5.3.2	Quantitative Auswertung	112
3.5.4	Diskussion	116
4	Experimenteller Teil	118
4.1	Allgemeine Bemerkungen	118
4.1.1	Geräte	118
4.1.2	Lösungsmittel und Chemikalien	119
4.2	Vergleichssubstanzen	120
4.3	Allgemeine Synthesevorschriften und dargestellte Verbindungen	122

4.3.1	Darstellung enantiomerenreiner substituierter N-Methyl-4-piperidyl benzilate	122
4.3.1.1	Darstellung substituierter Phenylglyoxylsäuren	122
4.3.1.2	Darstellung der (-)-8-Phenylmenthylester der unsubstituierten/ substituierten Phenylglyoxylsäure	127
4.3.1.3	Darstellung der (-)-8-Phenylmenthyl benzilate	130
4.3.1.4	Darstellung der substituierten (<i>R</i>)-/(<i>S</i>)-Benzilsäure	139
4.3.1.5	Darstellung der (<i>R</i>)- und (<i>S</i>)-Methyl benzilate	144
4.3.1.6	Darstellung der enatiomeren Zielstrukturen: (<i>R</i>)-/(<i>S</i>)-N-Methyl-4- piperidyl benzilate	147
4.3.2	Darstellung der Racemate substituierter N-Methyl-4-piperidyl benzilate	155
4.3.2.1	Darstellung racemischer Methyl benzilate	155
4.3.2.2	Darstellung racemischer N-Methyl-4-piperidyl benzilate	160
4.3.2.3	Darstellung substituierter (-)-Menthyl (<i>R,S</i>)-benzilate	167
4.3.3	Kristallisationsmethoden	168
4.3.3.1	Fraktionierte Kristallisation	168
4.3.3.2	Vorzugskristallisation	169
4.4	Analytische Methoden	169
4.4.1	UV-spektroskopische Untersuchungen	169
4.4.2	Kernresonanzspektroskopische Untersuchungen	169
4.4.3	Massenspektrometrische Untersuchungen	170
4.4.4	Chromatographische Methoden	170
4.4.4.1	Analytische Dünnschichtchromatographie	170
4.4.4.2	Analytische HPLC	171
4.4.4.3	Semipräparative HPLC	171

4.4.4.4	Präparative Säulenchromatographie	172
4.4.5	Polarimetrie	172
4.4.6	Circulardichroismus (CD) und Optische Rotationsdispersion (ORD)	173
4.4.7	Kapillarelektrophorese	173
4.5	Enzymatische Untersuchungen	173
4.6	Radioligand-Bindungsstudien an Muscarinrezeptoren	176
5	Zusammenfassung	177
	Literaturverzeichnis	180
	Verzeichnis der verwendeten Substanzbezeichnungen (Teil 2)	189

Verzeichnis der verwendeten Substanzbezeichnungen (Teil 1)

I	Synthesestufe I: Phenylglyoxylsäure-Derivate
II	Synthesestufe II: (-)-8-Phenylmenthyl/(-)-Menthyl phenylglyoxylat-Derivate
III	Synthesestufe III: (-)-8-Phenylmenthyl/(-)-Menthyl benzilat-Derivate
IV	Synthesestufe IV: Benzilsäure-Derivate
V	Synthesestufe V: Methyl benzilat-Derivate
VI	Synthesestufe VI: N-Methyl-4-piperidyl benzilat-Derivate
1	(R)-N-Methyl-4-piperidyl 4- <i>tert</i> -butylbenzilat
2	(S)-N-Methyl-4-piperidyl 4- <i>tert</i> -butylbenzilat
3	(R)-N-Methyl-4-piperidyl 4-n-butylbenzilat
4	(S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-n-butylbenzilat
5	(R)-N-Methyl-4-piperidyl 4-butoxybenzilat
6	(S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-butoxybenzilat
7	(R)-N-Methyl-4-piperidyl 4-dimethylaminobenzilat
8	(S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-dimethylaminobenzilat
9	(R)-N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethoxybenzilat
10	(S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethoxybenzilat
11	(R)-N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethylbenzilat
12	(S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethylbenzilat
13	(R)-N-Methyl-4-piperidyl 3,5-dimethoxybenzilat
14	(S)-N-Methyl-4-piperidyl 3,5-dimethoxybenzilat
15	(R)-N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat
16	(S)-N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat
17	(R)-N-Methyl-4-piperidyl 4-methylsulfonylbenzilat
18	(S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-methylsulfonylbenzilat
19	4- <i>tert</i> -Butylphenylglyoxylsäure
20	4-Methylmercaptophenylglyoxylsäure
21	4-n-Butylphenylglyoxylsäure
22	4-Butoxyphenylglyoxylsäure
23	4-Dimethylaminophenylglyoxylsäure
24	4-Trifluormethoxyphenylglyoxylsäure
25	(-)-8-Phenylmenthyl phenylglyoxylat
26	(-)-8-Phenylmenthyl 4- <i>tert</i> -butylphenylglyoxylat
27	(-)-8-Phenylmenthyl 4-methylmercaptophenylglyoxylat
28	(-)-8-Phenylmenthyl 4-n-butylphenylglyoxylat
29	(-)-8-Phenylmenthyl 4-butoxyphenylglyoxylat
30	(-)-8-Phenylmenthyl (S)-4- <i>tert</i> -butylbenzilat
31	(-)-8-Phenylmenthyl (S)-4-methylmercaptobenzilat
32	(-)-8-Phenylmenthyl (S)-4-n-butylbenzilat
33	(-)-8-Phenylmenthyl (S)-4-butoxybenzilat
34	(-)-8-Phenylmenthyl (S)-4-dimethylaminobenzilat
35	(-)-8-Phenylmenthyl (S)-4-trifluormethoxybenzilat
36	(-)-8-Phenylmenthyl (S)-4-trifluormethylbenzilat
37	(-)-8-Phenylmenthyl (S)-3,5-dimethoxybenzilat
38	(-)-8-Phenylmenthyl (S)-3-methoxybenzilat
39	(-)-8-Phenylmenthyl (S)-4-methylsulfonylbenzilat
40	(-)-8-Phenylmenthyl (R)-4- <i>tert</i> -butylbenzilat
41	(-)-8-Phenylmenthyl (R)-4-methylmercaptobenzilat
42	(-)-8-Phenylmenthyl (R)-4-n-butylbenzilat
43	(-)-8-Phenylmenthyl (R)-4-butoxybenzilat
44	(-)-8-Phenylmenthyl (R)-4-methylsulfonylbenzilat
45	(R)-/(S)-4- <i>tert</i> -Butylbenzilsäure
46	(R)-/(S)-4-n-Butylbenzilsäure

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Å	Ångström
Äqu.	Moläquivalente
c	Konzentration
CAS	Chemical Abstracts Registry Number
CCL	Candida cylindracea Lipase
CD	Circulardichroismus
CDCl ₃	Chloroform, deuteriert
CE	Kapillarelektrophorese
CHO-Zelle	Chinese-hamster-ovary-Zelle
CIP	CAHN-INGOLD-PRELOG Sequenzregel
d	Duplett bzw. Tag
DAB	Deutsches Arzneibuch
4-DAMP	1,1-Dimethyl-4-diphenylacetoxypiperidinium iodid
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO-d ₆	Dimethylsulfoxid, deuteriert
d. Th.	der Theorie
de	Diastereomenüberschuss (diastereomeric excess)
EAB	Europäisches Arzneibuch
E _L	Energie des isolierten Liganden
E _R	Energie des isolierten Rezeptorproteins
E _{RL}	Energie des Rezeptor-Ligand-Komplexes
ee	Enantiomenüberschuss (enantiomeric excess)
EI	Elektronenstoß-Ionisation
FM	Fließmittel
F _p	Schmelzbereich
gef.	gefunden
h	Stunde
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
I _{rel}	relative Intensität
IC ₅₀	Konzentration des Inhibitors, die 50 % des Radioliganden aus der Rezeptorverbindung verdrängt
K _D	Dissoziationskonstante des Radioliganden
K _p	Siedebereich
konz.	konzentriert
M	Multipllett
M	Molar
M ⁺	Molekülion
M _r	Relative Molekülmasse

M _{1/2/3} -Rezeptor	Muscarin-M _{1/2/3} -Rezeptor
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladung
n. b.	nicht bestimmt
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NMS	N-Methylscopolamin
[³ H]-NMS	[³ H]-N-Methylscopolamin bromid
Nu ⁻	Nucleophil
m/z	Masse/Ladung
ORD	Optische Rotationsdispersion
PCL	Pseudomonas cepacia Lipase
Phe	Phenyl
PKi	Negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstante des Inhibitor-Rezeptor-Komplexes bzw. Bindungskonstante
PKd	durch SCORE berechneter negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstante
PLE	Schweineleberesterase (pig liver esterase)
PPL	Schweinepankreaslipase (porcine pancreatic lipase)
R ²	Regressionskoeffizient
R _f	Retentionsfaktor
RP	Reverse-Phase
S	Singulett
sAr-H	H-Atom an substituierten Aromaten
SC	Säulenchromatographie
T	Triplett bzw. Zeit
t _R bzw. t _S	Retentionszeit des <i>R</i> - bzw. <i>S</i> -Enantiomers
theor.	theoretisch
THF	Tetrahydrofuran
TMEDA	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMS	Tetramethylsilan
UV	Ultraviolett
WWE	Wechselwirkungsenergie
δ _C	chemische Verschiebung von C-Atomen
δ _F	chemische Verschiebung von F-Atomen
δ _H	chemische Verschiebung von H-Atomen
ε	molarer Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Anticholinerg wirksame Verbindungen	20
Abb. 2: α -Hydroxyester mit stereogenem Zentrum	22
Abb. 3: Chirale Oxazoline	26
Abb. 4: Chirale Auxiliare	29
Abb. 5: Chirale Phenylmenthyl glyoxylate	30
Abb. 6: Diastereomerenzusammensetzung in Abhängigkeit von modifizierten Menthylderivaten bei der En-Reaktion an Glyoxylaten	30
Abb. 7: Konformationen des (-)-8-Phenylmenthols	31
Abb. 8: (-)-Menthyl- und (-)-8-Phenylmenthyl benzilate	37
Abb. 9: Reaktionsmechanismus zur Darstellung der <i>S</i> -konfigurierten Benzilsäure-ester IIIa (Methode A, Schema 9)	38
Abb. 10: Binäres Phasendiagramm eines Konglomerates (A) und racemischer Verbindungen (B) und (C)	49
Abb. 11: Modifikationsmöglichkeiten chiraler Benzilate	51
Abb. 12: HPLC-Chromatogramme nach ein- (A), zwei- (B) und dreimaliger (C) fraktionierter Kristallisation von (+)-(<i>R</i>)-N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (15) mit einer Mischung aus Weinsäurederivaten	53
Abb. 13: Chirale Oxazoline	64
Abb. 14: HPLC-Chromatogramm von (-)-Menthyl (<i>R,S</i>)-3,4-dimethoxybenzilat (85)	65
Abb. 15: Enantioselektivität der PLE in Abhängigkeit vom Substrat	74
Abb. 16: CD-Spektren von (<i>R</i>)- und (<i>S</i>)- N-Methyl-4-piperidyl 4- <i>tert</i> -butylbenzilat	77
Abb. 17: CD- und ORD-Kurven von (<i>S</i>)-N-Methyl-4-piperidyl 4-butoxybenzilat (6), $[\theta]$ und $[\phi]$ ($\text{Grad}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{decimol}^{-1}$)	78
Abb. 18: Anisotropie-Effekt als Ursache der Hochfeldverschiebung für <i>R</i> -konfigurierte Benzilate am Beispiel des (-)-8-Phenylmenthyl (<i>R</i>)-4- <i>tert</i> -butylbenzilates	82

Abb. 19: Enantiomerentrennung von (+)-(<i>R,S</i>)-N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat mittels CE	83
Abb. 20: Röntgenkristallstruktur von N-Methyl-4-pipridyl 4- <i>tert</i> -butylbenzilat (72)	85
Abb. 21: Röntgenkristallstruktur von N-Methyl-4-pipridyl 4-trifluormethylbenzilat (77)	85
Abb. 22: Röntgenkristallstruktur von N-Methyl-4-pipridyl 4-trifluormethoxybenzilat (76)	86
Abb. 23: Röntgenkristallstruktur von N-Methyl-4-pipridyl 3-methoxybenzilat (79)	86
Abb. 24: Röntgenkristallstruktur von N-Methyl-4-pipridyl 3,5-dimethoxybenzilat (78)	87
Abb. 25: Röntgenkristallstruktur von N-Methyl-4-pipridyl 4-methylsulfonylbenzilat (80)	87
Abb. 26: pK _i -Werte der Racemate 77 und 79	100
Abb. 27: M ₂ - und M ₃ -Präferenz basischer Benzilsäureester	101
Abb. 28: M ₁ -Rezeptor mit bindungsrelevanten Aminosäuren (modifiziert nach [98])	103
Abb. 29: Extrazelluläre Sicht auf M ₁ -Rezeptor mit Ligand (H: Helix)	104
Abb. 30: Modellierter M ₁ -Rezeptor mit dargestellter Bindungstasche	108
Abb. 31: Bindung von (<i>S</i>)-N-Methyl-4-piperidyl 4-methylsulfonylbenzilat an den M ₁ -Rezeptor. Rot markiert sind die Aminosäuren, die innerhalb der Rezeptorsubtypen (M ₁ , M ₂ und M ₃) nicht konserviert vorliegen. Die Wasserstoffbrücken sind durch punktierte Linien dargestellt.	109
Abb. 32: Bindung von (<i>R</i>)-N-Methyl-4-piperidyl 4-methylsulfonylbenzilat an den M ₁ -Rezeptor	110
Abb. 33: Wechselwirkungsenergien (WWE) für <i>S</i> - und <i>R</i> -enantiomere Benzilate an M ₁ -, M ₂ - und M ₃ -Rezeptoren	115

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Enantiomere Zielstrukturen der N-Methyl-4-piperidyl benzilate	19
Tab. 2: Synthese substituierter Phenylglyoxylsäuren Ib	34
Tab. 3: (-)-8-Phenylmenthyl glyoxylate	35
Tab. 4: HPLC-Chromatogramme zur Bestimmung der enantiomeren Reinheit von (S)-Methyl 3-methoxybenzilat (61) (Methode A)	39
Tab. 5: Resultate der asymmetrischen Induktion für ausgewählte Vertreter	40
Tab. 6: Schmelzpunkte der Racemate und Enantiomere von N-Methyl-4-piperidyl benzilaten	48
Tab. 7: Racemattrennung mittels Substanzfamilien	53
Tab. 8: Fraktionierte Kristallisation mit Weinsäurederivaten (O,O'-Dibenzoylweinsäure/ O,O'-Di-p-toluoylweinsäure 1:10)	54
Tab. 9: Analytische Trennung strukturverwandter Verbindungen	59
Tab. 10: Direkte Racemattrennung von 3-Methoxybenzilsäure (52), Methyl 3-methoxybenzilat (69), N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (79)	60
Tab. 11: Retentionszeiten und chromatographische Auflösung R_S von enantiomeren N-Methyl-4-piperidyl benzilaten	62
Tab. 12: Elutionsreihenfolge strukturell verwandter Benzilate	64
Tab. 13: Diastereomerentrennung durch RP-HPLC	65
Tab. 14: Enzymatische Umsetzung von racemischen Benzilsäurederivaten	70
Tab. 15: Resultate der enzymatischen Hydrolyse	71
Tab. 16: Spezifische Drehung enantiomerer Benzilate	76
Tab. 17: Chemische Verschiebungen relevanter Substituentenprotonen von (-)-8-Phenylmenthyl benzilaten	80
Tab. 18: Chemische Verschiebungen relevanter Substituentenprotonen von (-)-Menthyl benzilaten	81

Tab. 19: Konformationen der N-Methyl-4-piperidyl benzilate	84
Tab. 20: Untersuchungen zur Racemisierung von (<i>R</i>)-N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (15) im pH-Bereich von 2 bis 9 bei einer Temperatur von 80°C	90
Tab. 21: Verlauf der Racemisierung von (<i>R</i>)-N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (15) im schwefelsauren Milieu	90
Tab. 22: Verlauf der Epimerisierung von (-)-Menthyl 3,4-dimethoxybenzilat (Peak 1)* A und (-)-8-Phenylmenthyl (<i>S</i>)-3-methoxybenzilat B im schwefelsauren Milieu	91
Tab. 23: pK _i -Werte an den Muscarinrezeptorsubtypen	96
Tab. 24: Aminosäuren der Bindungstasche des M ₁ -, M ₂ - und M ₃ -Rezeptors	108
Tab. 25: Berechnete Wechselwirkungsenergien (WWE) der Rezeptor-Ligand-Komplexe	114
Tab. 26: Bezifferung der Phenylglyoxylsäuren	122
Tab. 27: Bezifferung der (-)-8-Phenylmenthyl phenylglyoxylate	127
Tab. 28: Bezifferung der <i>S</i> -konfigurierten* (-)-8-Phenylmenthyl benzilate	131
Tab. 29: Bezifferung der <i>R</i> -konfigurierten* (-)-8-Phenylmenthyl benzilate	137
Tab. 30: Bezifferung der (<i>R</i>)-/(<i>S</i>)-Benzilsäure	140
Tab. 31: Bezifferung der (<i>R</i>)-/(<i>S</i>)-Methyl benzilate	144
Tab. 32: Bezifferung der (<i>R</i>)-/(<i>S</i>)-N-Methyl-4-piperidyl benzilate	148
Tab. 33: Bezifferung der racemischen (<i>R,S</i>)-Methyl benzilate	156
Tab. 34: Bezifferung der racemischen (<i>R,S</i>)-N-Methyl-4-piperidyl benzilate	161
Tab. 35: Synthetisierte (-)-Menthyl (<i>R,S</i>)-benzilate	167
Tab. 36: Fließmittelgemische der Dünnschichtchromatographie	170
Tab. 37: Detektionsmittel der Dünnschichtchromatographie	170

Verzeichnis der Schemata

Schema 1: Angriff des Nucleophils an das Carbonyl-C-Atom des Phenylglyoxylates	22
Schema 2: Chirale Information im Ester	23
Schema 3: Prelog-Regel, S: small, M: medium, L: large	24
Schema 4: Addition von GRIGNARD- und Organolithium-Reagenzien an α -Keto-oxazoline	25
Schema 5: Reaktionsmechanismus von Aryllithium an α -Ketooxazoline und daraus resultierende absolute Konfiguration	25
Schema 6: Stereoselektive Addition an vicinalen <i>cis</i> -Aminoindanolen	27
Schema 7: Symmetrische und unsymmetrische Organozinkverbindung	28
Schema 8: Übergangszustand - Angriff des organischen Restes des unsymmetrischen Zinkorganyls von der si-Seite (R: Alkyl)	29
Schema 9: Darstellung von <i>R</i> - und <i>S</i> -konfigurierten Benzilsäureestern am Beispiel des 3-Methoxybenzilsäureesters IIIa und IIIb	33
Schema 10: Mögliche Abbauege von Phenylglyoxylsäuren	35
Schema 11: α,α -Dichlormethyl methyl ether zur Darstellung von Säurechloriden der α -Ketosäuren	36
Schema 12: Nachfolgende Syntheseschritte zum N-Methyl-4-piperidyl benzilat am Beispiel der 3-Methoxy-Verbindung	42
Schema 13: Enzymatische Hydrolyse von Benzilsäureestern	68
Schema 14: Enzymatische Umsetzung von Benzilsäurederivaten	70
Schema 15: <i>syn</i> - und <i>anti</i> -Konformere	83
Schema 16: Übersicht zu den Konformationen des N-Methyl-4-piperidylrings	84
Schema 17: Säurekatalysierte Racemisierung über ein Carbokation	92

Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Einfluss des GRIGNARD-Reagenzes und des ZnX_2 -Zusatzes auf den Diastereomerenüberschuss (de) der Additionsreaktion an (-)-Menthylphenylglyoxylat in Tetrahydrofuran bei -78°C [20] (s. Schema 8)	28
Diagramm 2: Racemisierung von Benzilaten nach 1 h Schütteln (Raumtemperatur) und zehnminütigem Erwärmen (70°C)	93
Diagramm 3: pK_i -Werte der <i>R</i> - und <i>S</i> -Enantiomere an den muscarinergen Rezeptorsubtypen	97
Diagramm 4: M_3/M_1 -Affinitätsverhältnisse enantiomerer Benzilate	98
Diagramm 5: M_3/M_2 -Affinitätsverhältnisse enantiomerer Benzilate	99
Diagramm 6: Korrelation zwischen experimentellen pK_i -Werten ($\text{pK}_i(\text{exp})$) und berechneten Wechselwirkungsenergien (WWE)	116

1 Einleitung und Problemstellung

Chirale synthetische Arzneistoffe gelangen zunehmend als reine Enantiomere anstelle der bislang eingesetzten Racemate zur therapeutischen Anwendung [1]. Dieser Trend in der Arzneistoffentwicklung berücksichtigt die lange Zeit vernachlässigten unterschiedlichen pharmakodynamischen und -kinetischen Eigenschaften der spiegelbildlichen Enantiomere. Dabei stellt das Eutomer das stärker wirksame oder das weniger mit Nebenwirkungen belastete Enantiomer dar. Das Distomer kann hingegen ohne Wirkung, in seltenen Fällen konträr, meist aber schwächer wirksam sein. Ein Beispiel eines sogar toxisch wirkenden Distomers ist R-DOPA. Sein spiegelbildliches Pendant L-DOPA, das in der Therapie des Morbus Parkinson eingesetzt wird, muss daher in hoher optischer Reinheit vorliegen [2]. Ein Racemat stellt, drastisch formuliert, eine 50 %ige Verunreinigung des Eutomers mit dem Distomer dar. Nicht in jedem Fall ist jedoch die Anwendung des isolierten Eutomers anstelle des Racemates sinnvoll und sollte kritisch hinterfragt werden. Enantiomere Arzneistoffe können im Organismus enzymatischen Prozessen unterliegen, die eine Racemisierung des Enantiomers zur Folge haben. Damit ist ein therapeutischer Vorteil durch Applikation des Eutomers nicht mehr gegeben.

Forschungsschwerpunkt der vorliegenden Arbeit bilden arylsubstituierte N-Methyl-4-piperidyl benzilate. Sind deren Aromaten verschiedenartig substituiert, handelt es sich um chirale Verbindungen mit einem zentralen asymmetrischen Kohlenstoffatom. Aufgrund der ausgeprägten anticholinergen Wirkung stellen N-Methyl-4-piperidyl benzilate potenzielle Arzneistoffe zur Behandlung von Harninkontinenz und Ulkuserkrankung dar. Einigen Vertretern von Benzilaten werden neben den zentral anticholinergen Effekten auch dopaminerge Wirkungen zugesprochen [3, 4]. Verbindungen mit zentral anticholinergen und zusätzlich dopaminergen Effekten können eine neue Wirkstoffklasse von Antiparkinsonika begründen.

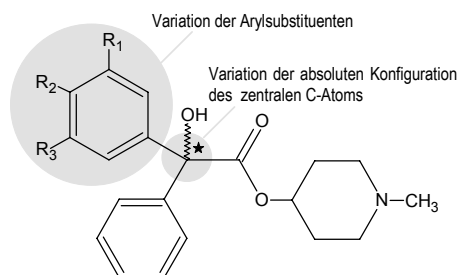
Das pharmakologische Profil der Racemate neuer kernsubstituierter N-Methyl-4-piperidyl benzilate wurde bereits ausführlich untersucht [5]. In Radioligand-Bindungsstudien wurde insbesondere die Affinität und Subtypenselektivität der racemischen N-Methyl-4-piperidyl benzilate an muscarinergen Rezeptoren (M_1 bis M_5) in Abhängigkeit von der aromatischen Substitution genauer betrachtet. Neben schwachen Anticholinergika wurden hoch potente Benzilate gefunden, die mit dem Standardantagonisten Atropin vergleichbar sind. Die untersuchten Verbindungen weisen eine leichte Präferenz zum M_1 -Rezeptor auf. Die hohe


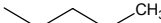
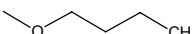

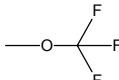


Toxizität bekannter, unsubstituierter Benzilate konnte unter Erhalt der anticholinergen Wirksamkeit durch Kernfunktionalisierung gesenkt werden.

Untersuchungen zu den enantiomeren N-Methyl-4-piperidyl benzilaten (Eutomer und Distomer) wurden bisher nicht durchgeführt. Dabei lassen enantiomere Verbindungen nicht nur Affinitätsunterschiede an den Muscarinrezeptoren, sondern auch unterschiedliche Selektivität an den muscarinergen Rezeptorsubtypen erwarten. Eine Modifizierung der Wirkqualität in Abhängigkeit von der absoluten Konfiguration des zentralen asymmetrischen Kohlenstoffatoms für N-Methyl-4-piperidyl benzilate wäre somit denkbar. Erste Hinweise auf eine Subtypenselektivität an Muscarinrezeptoren in Abhängigkeit vom stereogenen Zentrum konnten für parasubstituierte Benzilate des 3-Chinuclidinols erhalten werden [6]. Die Entwicklung von Verbindungen mit muscarinerger Subtypenselektivität besitzt eine besondere Bedeutung in der Therapie von Harninkontinenz (M_3 -Selektivität) und Ulkuserkrankung (M_1 -Selektivität).

Ausgehend von der Hypothese, dass die stereochemischen Eigenschaften von N-Methyl-4-piperidyl benzilaten Auswirkungen auf die Affinität und Selektivität zu den einzelnen Muscarinrezeptoren haben, ist das Ziel dieser Arbeit, durch Variation von sterischen Parametern eine weitere Wirkungsoptimierung dieser Substanzklasse vorzunehmen. Zudem soll der Einfluss elektronisch verschiedenartiger Arylsubstituenten auf die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung untersucht werden (Tab. 1). Dazu werden die reinen Enantiomere der arylsubstituierten N-Methyl-4-piperidyl benzilate dargestellt, die optischen Antipoden analytisch charakterisiert und die isolierten Enantiomere Radioligand-Bindungsstudien unterzogen. Die Arbeit baut auf Untersuchungen zu racemischen N-Methyl-4-piperidyl benzilaten [3] auf und ergänzt diese durch die stereochemische Betrachtung der Enantiomere. Zur Darstellung der enantiomerenreinen Verbindungen werden stereoselektive Synthese, Kristallisationsmethoden, chromatographische und enzymatische Methoden systematisch untersucht. Die hierbei erhaltenen Zielstrukturen variieren in der absoluten Konfiguration des asymmetrischen zentralen Kohlenstoffatoms und der Substitution des aromatischen Rings. In Radioligand-Bindungsstudien soll der Einfluss der absoluten Konfiguration und der elektronisch verschiedenartigen Arylsubstituenten auf die Affinität und Subtypenselektivität an muscarinergen Rezeptoren untersucht werden.

Tab. 1: Enantiomere Zielstrukturen der N-Methyl-4-piperidyl benzilate



Absolute Konfiguration		Arylsubstitution		
<i>R</i>	<i>S</i>	R₁	R₂	R₃
1	2	H		H
3	4	H		H
5	6	H		H
7	8	H		H
9	10	H		H
11	12	H		H
13	14	—OCH ₃	H	—OCH ₃
15	16	—OCH ₃	H	H
17	18	H		H

Die klassische Wirkstoffoptimierung, bei der systematisch die Leitstruktur abgewandelt und die Auswirkung dieser Abwandlung auf Affinität und Subtypenselektivität an muscarinergen Rezeptoren untersucht wird, soll durch Molecular Modelling sinnvoll ergänzt werden. Diese in der Arzneistoffforschung anerkannte computergestützte Methode wird in dieser Arbeit für basisch substituierte Benzilsäureester eingesetzt. Hierbei soll auf Grundlage der experimentellen Radioligand-Bindungsdaten die Bindungsstelle im transmembranären Bereich des G-proteingekoppelten Rezeptors identifiziert werden. Das realistische dreidimensionale Bindungsmodell antagonistisch wirksamer Benzilate an Muscarinrezeptoren soll Aufschluss über räumliche Wechselwirkungen des Liganden mit dem Rezeptorprotein geben.

2 Theoretischer Teil

2.1 Die Leitstruktur N-Methyl-4-piperidyl benzilat und verwandte Verbindungen mit anticholinerger Wirkung

Die Leitstruktur der vorliegenden Arbeit ist das N-Methyl-4-piperidyl benzilat – ein M-Cholinozeptor-Antagonist (Abb. 1). Durch kompetitiven Antagonismus blockieren M-Cholinozeptor-Antagonisten die acetylcholinvermittelte Erregungsübertragung an Muscarinrezeptoren. Bisher wurden 5 Subtypen der Muscarinrezeptoren mit molekularbiologischen Techniken nachgewiesen – M₁ (ZNS), M₂ (Herz), M₃ (glatte Muskulatur), M₄ (Vorderhirn, Hippocampus), M₅ (unbekannt). Aufgrund der vielfältigen Funktionen der Muscarinrezeptoren werden M-Cholinozeptor-Antagonisten unter anderem bei Spasmen der glatten Muskulatur, Parkinson-Syndrom, bradykarden Herzrhythmusstörungen eingesetzt [7]. Durch eine Verbesserung der Subtypenselektivität können Verbindungen gezielt für eine Indikation eingesetzt werden. Daneben lassen sich unerwünschte Wirkungen minimieren. Jedoch erschwert die hohe Homologie innerhalb der Muscarinrezeptorsubtypen das Auffinden selektiv wirksamer Verbindungen.

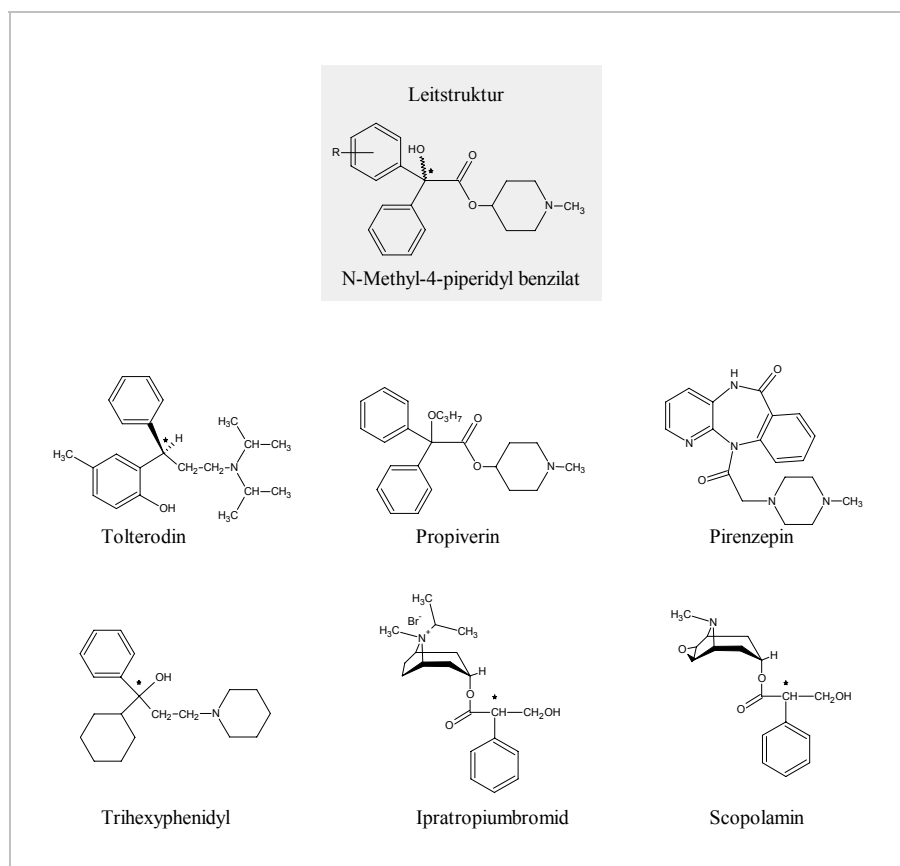


Abb. 1: Anticholinerg wirksame Verbindungen

Harninkontinenz. Für die Behandlung von Harninkontinenz werden gegenwärtig Arzneistoffe, die an Subtypen M₁ bis M₅ des muscarinergen Rezeptors wenig selektiv antagonistisch wirken, angewendet. Nebenwirkungen sind dabei Mundtrockenheit, Mydriasis und Herz-Kreislaufbeschwerden [8, 9]. Solche Anticholinergika sind das chirale Tolterodin (*R*-Enantiomer) und das achirale Propiverin. Ziel ist die Entwicklung blasenselektiver, d. h. bevorzugt am M₃-Rezeptor angreifende Therapeutika [10].

Ulkrankung. Ein Therapeutikum mit M₁-selektiven Eigenschaften wie das achirale Pirenzepin kann zur Behandlung der Ulkrankung eingesetzt werden [11]. Durch kompetitive Blockade der M₁-Rezeptoren wird die Salzsäure- und Pepsinogen-Sekretion gehemmt. Nichtselektive Muscarinantagonisten wie Atropin zeigen diesen Effekt erst bei einer Dosierung, die bereits verstärkte Nebenwirkungen verursacht.

Parkinson-Syndrom. Zur medikamentösen Therapie des Parkinson Syndroms werden unter anderem dopaminerge Agonisten (Bromocriptin, Lisurid) und zentral wirksame Anticholinergika eingesetzt [12]. Das Trihexyphenidyl, eine chirale Verbindung und zentral wirksames Anticholinergikum, wird derzeit als Racemat zur Parkinsontherapie angeboten. Die Verbindungsklasse der N-Methyl-4-piperidyl benzilate bilden mit ihrer mitunter dualistischen anticholinergen und indirekt dopaminergen Wirkung eine neue Klasse potenzieller Antiparkinsonika [5].

Weitere Indikationsgebiete anticholinerg wirksamer Verbindungen sind Asthma bronchiale (Bronchodilator: Ipratropiumbromid) und Kinetosen (Antiemetikum: Scopolamin).

In der experimentellen Pharmakologie finden Tritiummarkierte Benzilate als hochaffine, nicht selektive Liganden des Muscarinrezeptors zur quantitativen Erfassung von Pharmakon-Muscarinrezeptor-Wechselwirkungen in Radioligand-Bindungsstudien Anwendung. Wegen ihrer psychotomimetischen Wirkung standen basische Benzilsäureester für die Entwicklung von chemischen Kampfstoffen im Interesse. Das 3-Chinuclidinyl benzilat gehörte seit etwa 1961 zum Bestand der strukturmäßigen Kampfstoffe der US-Armee [13].

2.2 Stereoselektive Darstellung chiraler α -Hydroxyester – eine Literaturübersicht

2.2.1 Allgemein

Tertiäre α -Hydroxyester finden sich als Grundstruktur in einer Vielzahl biologisch wirksamer Verbindungen wieder. Besonders in der Klasse der Muscarinrezeptor-Antagonisten stellen tertiäre α -Hydroxysäuren in Form von Phenyl- oder Diphenyl-Derivaten einen Grundbaustein dar (Abb. 2).

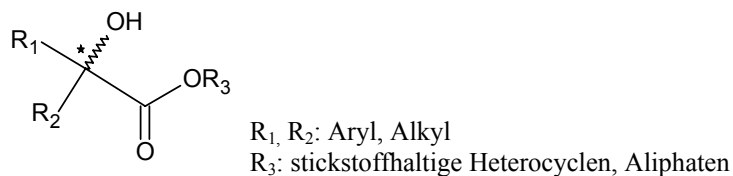
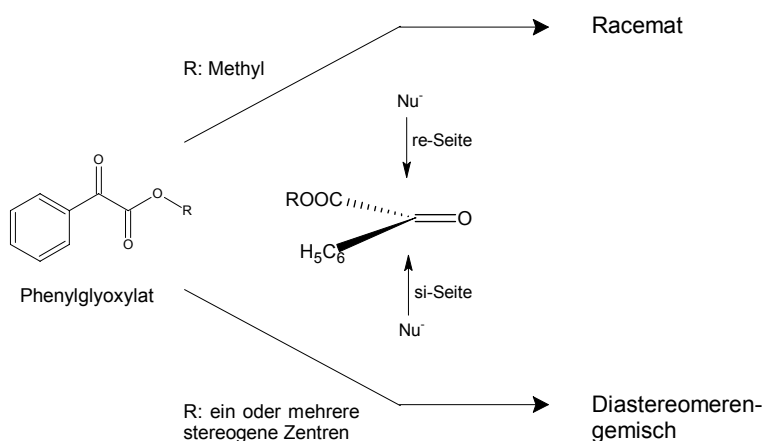


Abb. 2: α -Hydroxyester mit stereogenem Zentrum

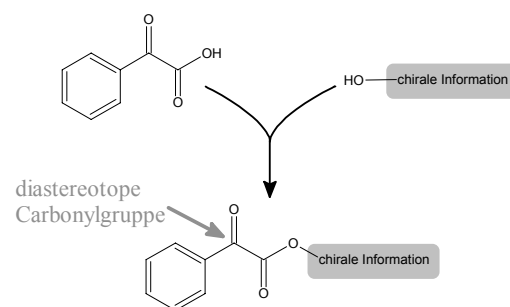
Racemische α -Hydroxyester. Die Synthese racemischer α -Hydroxyester gelingt durch Addition metallorganischer Reagenzien an die Carbonylfunktion von α -Ketoestern. Der Angriff des Nucleophils (Nu^-) an das sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffatom kann aufgrund der Planarität der Carbonylgruppe von beiden Seiten gleichermaßen erfolgen (Schema 1). Handelt es sich wie bei Methyl phenylglyoxylat um enantiotope Seiten, erfolgt der Angriff des Nucleophils von der re- und si-Seite. Als Folge entstehen *R*- und *S*- Enantiomere im Verhältnis 1:1 (Racemat).



Schema 1: Angriff des Nucleophils an das Carbonyl-C-Atom des Phenylglyoxylates

Optisch aktive α -Hydroxyester. Die Notwendigkeit der Darstellung enantiomerer α -Hydroxyester führte in der Vergangenheit zu einer intensiven Suche, durch stereoselektive Synthese zu den Enantiomeren zu gelangen.

Optisch aktive α -Hydroxyester lassen sich durch Addition von organometallischen Reagenzien an chiralen α -Ketoestern gewinnen. Die chirale Information befindet sich im Esterrest und kann als Alkohol unproblematisch in den Ester eingeführt und ebenso leicht wieder entfernt werden (Schema 2). Der nucleophile Angriff auf eine diastereotop Carbonylgruppe führt zur



Schema 2: Chirale Information im Ester

Bildung eines Diastereomerengemisches. Das Verhältnis der Diastereomere wird entscheidend von der Art der im Molekül befindlichen chiralen Information bestimmt. Die Funktionsweise des chiralen Hilfsmittels besteht darin:

- ☐ das angreifende Nucleophil (Metallorganyl) durch Komplexierung oder Chelatisierung räumlich zu fixieren und/oder
- ☐ durch sterische Hinderung eine Seite (re- oder si-Seite) bevorzugt abzuschirmen.

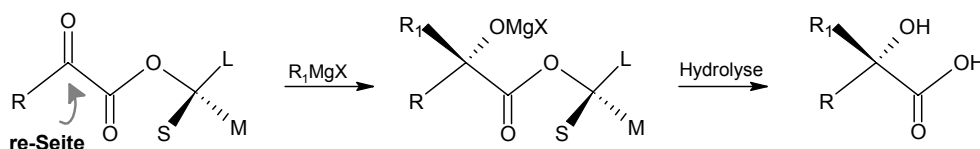
Eine große Anzahl chiraler Alkohole wurde in diesem Zusammenhang untersucht. Von denen sich die meisten alkoholischen Auxiliare als nicht effizient erwiesen.

Alle herkömmlichen und in der Literatur beschriebenen Versuche, enantiomerenreine α -Hydroxyester stereoselektiv zu synthetisieren, basieren im Wesentlichen auf einer Addition von metallorganischen Reagenzien an chiralen α -Ketoestern. Die Methoden differieren hinsichtlich der chiralen Information im alkoholischen Rest des Ketoesters, der verwendeten Metallorganen, des Lösungsmittels, der Temperatur und Zusätze wie N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TMEDA) und Zinkchlorid.

MC KENZIE legte 1904 den Grundstein für die asymmetrische Addition an α -Ketoestern [14]. Unter Verwendung der neu entdeckten GRIGNARD-Reaktion war das der Beginn intensiver Studien. Die Untersuchungen wurden durch PRELOG fortgesetzt [15], dessen daraus hervorgehende Verallgemeinerung als PRELOG-Regel [16] noch heute Bestand hat. Seither wurden viele Versuche unternommen, die enantiomere Reinheit der bisher nur enantiomer angereicherten Produkte (0 bis 30 % ee) zu erhöhen.

2.2.2 PRELOG-Regel

Durch Addition von GRIGNARD-Reagenzien an α -Ketoester eines chiralen Alkohols entsteht ein neues stereogenes Zentrum mit unbekannter absoluter Konfiguration. Die PRELOG-Regel beschreibt den Angriff des Nucleophils (re- oder si-Seite) in Abhängigkeit von der Konfiguration des chiralen sekundären oder tertiären Alkohols (Schema 3).



Schema 3: Prelog-Regel, S: small, M: medium, L: large

Wenn die Carbonylgruppen des Ketoesters antiperiplanar angeordnet sind und der L-Substituent auf der gleichen Ebene wie die Carbonylgruppen steht, greift das GRIGNARD-Reagenz (R_1MgX) von der Seite mit dem kleinen Substituenten (S) an. Das heißt: besitzt der chirale Alkohol S-Konfiguration, erfolgt der Angriff des GRIGNARD-Reagenzes von der re-Seite.

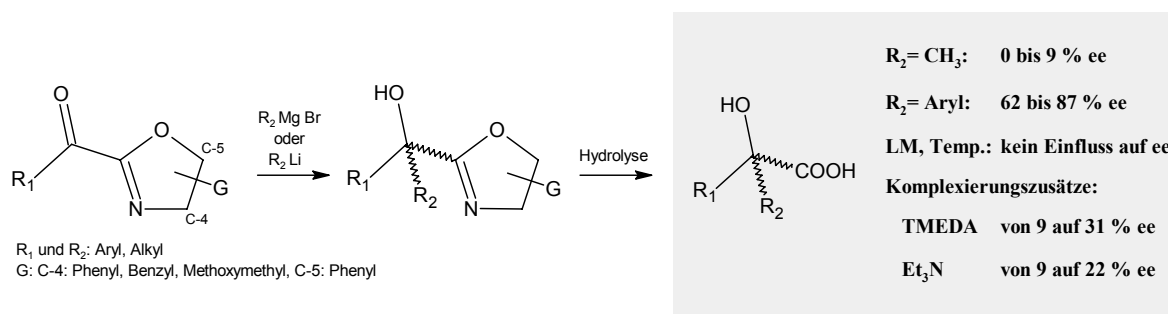
Anwendung der Prelog-Regel:

- ☐ Bestimmung der absoluten Konfiguration des neuen stereogenen Zentrums der α -Hydroxysäure bei bekannter Konfiguration des Alkohols,
- ☐ Bestimmung der absoluten Konfiguration sekundärer oder tertiärer Alkohole [16].

2.2.3 Chirale α -Ketooxazoline

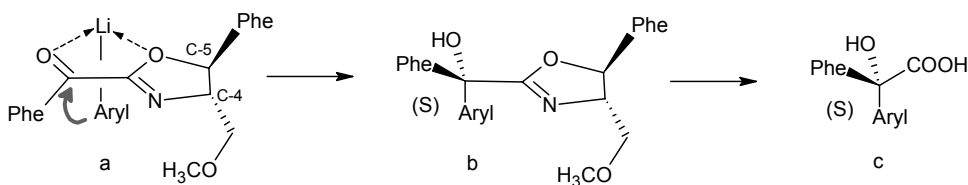
MEYERS und SLADE verwendeten erstmals chirale α -Ketooxazoline als chirale Gruppe [17]. Sie untersuchten die Addition von GRIGNARD- und Organolithium-Reagenzien (Schema 4). Um ein Optimum an chiraler Induktion zu erreichen, wurden Lösungsmittel, Temperatur und die Substitution (G) des chiralen α -Ketooxazolins variiert. Die Addition von Methylmagnesiumbromid oder Methyllithium lieferte eine enttäuschende chirale Induktion (0 bis 9 % ee). Durch Änderung des Lösungsmittels (Diethylether, Tetrahydrofuran) und der Temperatur (-98 bis 0°C) wurde keine Steigerung erzielt. Ein

Versuch, die sehr schnell ablaufende Additionsreaktion selektiver zu gestalten, wurde durch Zugabe von TMEDA als Coreaktant erreicht. Durch Komplexierung des GRIGNARD-Reagenzes mit TMEDA konnte die Selektivität signifikant gesteigert (von 9 auf 31 % ee) werden. Desgleichen wurde die Selektivität durch Zugabe von Triethylamin zum GRIGNARD-Reagenz erhöht (von 9 auf 22 % ee). Bereits ASHBY zeigte, dass der Einsatz von Triethylamin, welches zu einem monomeren GRIGNARD-Triethylamin-Komplex führt, von Vorteil ist [18]. Weiterhin konnte durch Vergrößerung des Raumbedarfes der organischen Reste des Metallorganyls die asymmetrische Induktion gesteigert werden. In diesem Zusammenhang wurde der Einsatz von Arylmetallen untersucht. Die Anwendung von Aryllithium-Reagenzien bei -78°C in Tetrahydrofuran ergab 62 bis 87 % ee. Die entsprechenden GRIGNARD-Reagenzien zeigten vergleichbare Ergebnisse.



Schema 4: Addition von GRIGNARD- und Organolithium-Reagenzien an α -Ketooxazoline

Ein Modell des Übergangszustandes (**a**) und eine mögliche Erklärung für die gefundene absolute Konfiguration (**b** und **c**) sind in Schema 5 dargestellt. Lithium komplexiert im primären Schritt beide Sauerstoffatome. Die Phenylgruppe am C-5 des Ketooxazolins schirmt die Oberseite des Rings ab. Dadurch greift das Arylcarbanion bevorzugt von der Unterseite an.



Schema 5: Reaktionsmechanismus von Aryllithium an α -Ketooxazoline und daraus resultierende absolute Konfiguration

Mit Änderung des Substitutionsmusters am Ketooxazolin konnte die Relevanz der Position 5 und der Phenylgruppe in Position 5 für die asymmetrische Induktion bewiesen werden. Durch eine Benzyl-/Phenylsubstitution an C-4 (Abb. 3, **e** und **f**) wurden nur geringe enantiomere Überschüsse von 0 bis 40% ee erzielt. Überraschenderweise führte ein Austausch der Methoxymethylgruppe (**g**) in Position 4 zu einem deutlichen Verlust der Selektivität gegenüber Verbindung **d**. Somit ist die Methoxymethylgruppe neben der Phenylgruppe am C-5 ebenfalls an den sterischen Wechselwirkungen beteiligt.

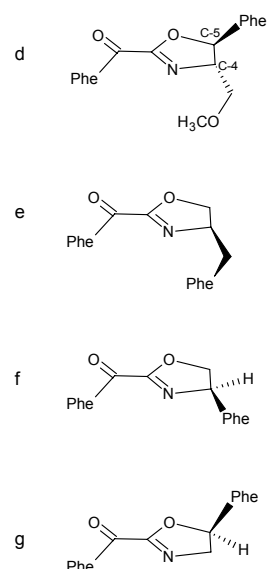


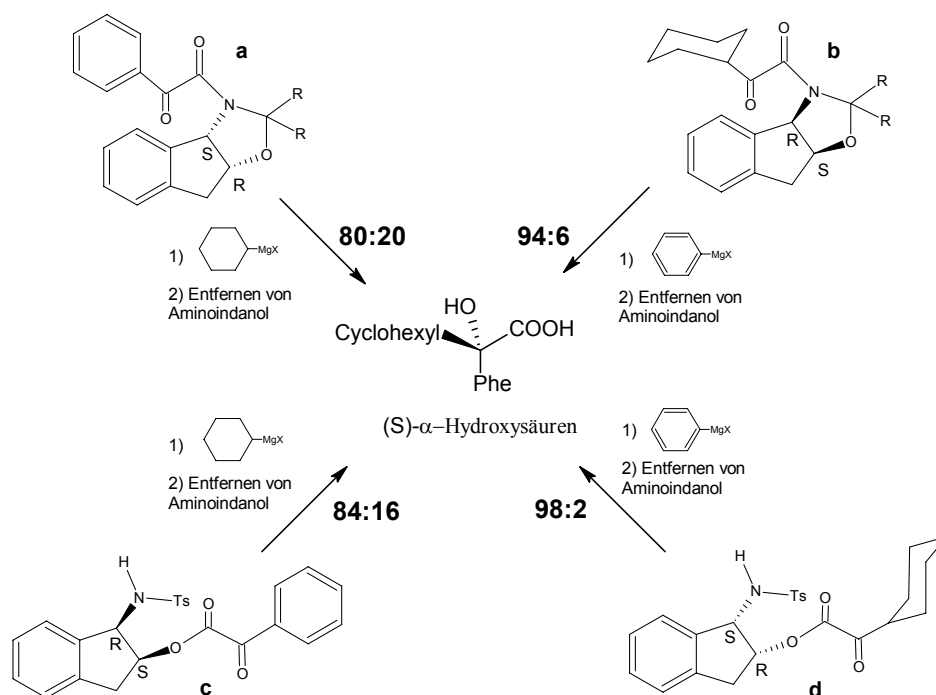
Abb. 3: Chirale Oxazoline

2.2.4 Vicinale *cis*-Aminoindanole

Senanayake et al. untersuchten rigide Aminoalkohole als chirale Hilfsmittel für die stereoselektive Synthese von optisch aktiven tertiären α -Hydroxysäuren. Experimentell wurden vicinale *cis*-Aminoindanole in den Strukturen **a**, **b**, **c** und **d** ausführlicher betrachtet (Schema 6) [19].

Zunächst wurde die diastereoselektive Addition vom Cyclohexyl-GRIGNARD-Reagenz an Struktur **a** unter verschiedenen Bedingungen mit und ohne Zusätze (Zn^{2+} , Ti^{4+} , Mg^{2+}) untersucht. Interessanterweise liefert hierbei die Additionsreaktion bei einer Temperatur von 22°C und unter Zusatz von Zinkchlorid die höchste Selektivität (80:20) (Ausbeute nur 50%). Durch Addition von Phenylmagnesiumchlorid an Cyclohexylketoamid (**b**) in Tetrahydrofuran bei -78°C konnte eine bemerkenswerte Steigerung der Selektivität (94:6) und höhere Ausbeute (86 %) beobachtet werden.

Da die Hydrolyse der sterisch anspruchsvollen Amide nur mit geringer Ausbeute verläuft, stellen leicht hydrolysierbare Hydroxylester basierend auf dem Indolgrundgerüst eine Weiterentwicklung dar. Bei der Umsetzung von Struktur **c** mit Cyclohexylmagnesiumbromid und Zinkchlorid-Zusatz bei 22°C in Tetrahydrofuran wurde eine Enantiomerenanreicherung von nur 84:16 erhalten. Hingegen wies die Addition von Phenylmagnesiumbromid in Tetrahydrofuran bei 0°C an Struktur **d** eine beachtliche diastereofaciale Selektivität von 98:2 auf.



Schema 6: Stereoselektive Addition an vicinalen *cis*-Aminoindanolen [19]

2.2.5 (-)-Menthyl phenylglyoxylate

Der Addition von GRIGNARD-Reagenzien an (-)-Menthyl phenylglyoxylate unter Zusatz von Zinkhalogeniden widmeten sich BOIREAU et al. eingehender (Schema 8). Der Einfluss folgender Parameter auf die asymmetrische Induktion wurde untersucht [20]:

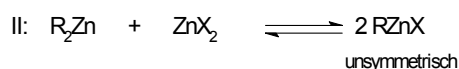
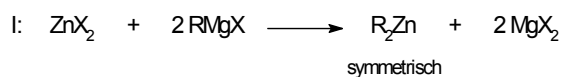
- ☐ Art des Lösungsmittels
- ☐ Art des Halogenids in ZnX_2
- ☐ Verhältnis Zinkhalogenid/GRIGNARD-Reagenz
- ☐ Raumbedarf des organischen Restes R des Metallorganyls RMgX

Durch Variation des Lösungsmittels (Diethylether, Tetrahydrofuran) wurde keine signifikante Steigerung der Ausbeute und der asymmetrischen Induktion erzielt. Der Zusatz von Zinkhalogenid wirkt sich positiv auf das Diastereomerenverhältnis aus (Diagramm 1), wobei die Art des Halogenids (ZnCl_2 , ZnBr_2) unbedeutend für die Selektivität ist. Die Reaktivität und Ausbeute kann entscheidend durch das Verhältnis Zinkhalogenid/GRIGNARD-Reagenz gesteuert werden. Ein vorgelagerter Prozess ist die Bildung von symmetrischer und unsymmetrischer Organozinkverbindung. Dabei stellt die

Unsymmetrische Organozinkverbindung

die reaktive Form dar und wird durch einen Überschuss von ZnX_2 gebildet (Schema 7, II). Ein zu großer Überschuss von ZnX_2 inhibiert die Additionsreaktion, da ZnX_2 und RZnX um die Carbonyle konkurrieren (s. Übergangszustand, Schema 8). Die reaktivste und selektivste Form wurde

durch ein Verhältnis von 0,75/1 und 1/1 ZnX_2/RMgX erhalten. Der Raumbedarf des organischen Restes des GRIGNARD-Reagenzes hat innerhalb der untersuchten Parameter den größten Einfluss für die Selektivität der diastereofacialen Addition (Schema 8, Diagramm 1).



Schema 7: Symmetrische und unsymmetrische Organozinkverbindung

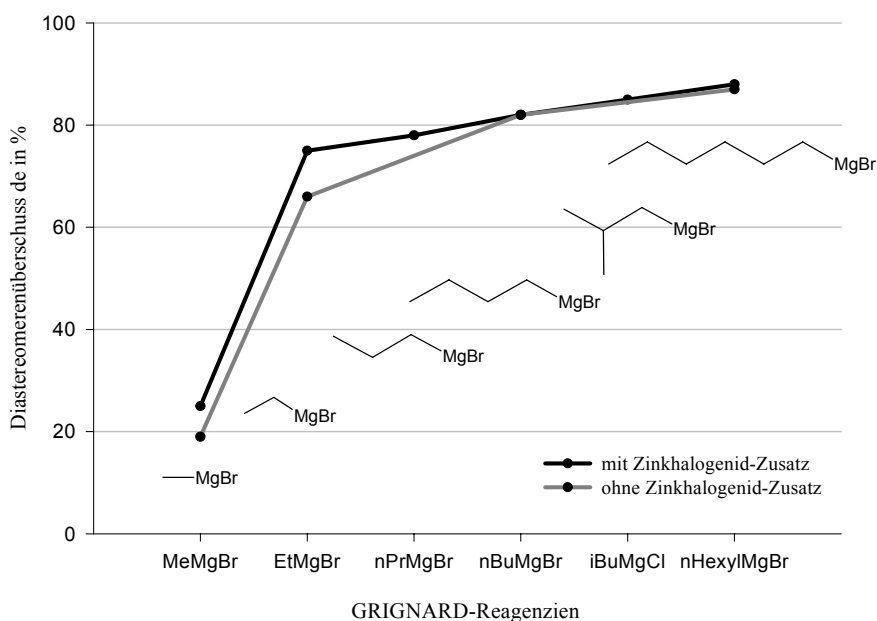
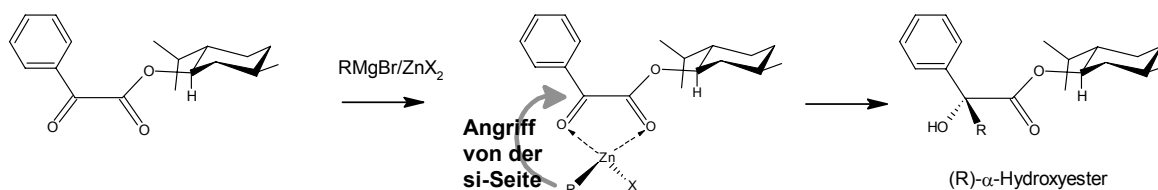


Diagramm 1: Einfluss des GRIGNARD-Reagenzes und des ZnX_2 -Zusatzes auf den Diastereomenüberschuss (de) der Additionsreaktion an (-)-Menthyl phenylglyoxylat in Tetrahydrofuran bei -78°C [20] (s. Schema 8)

Der Diastereomenüberschuss schwankt in Abhängigkeit vom Raumbedarf des GRIGNARD-Reagenzes zwischen 20 und 80 %. Durch voluminöse organische Reste wie n-Hexyl oder iso-Butyl lassen sich sogar Werte von 86 % de erreichen.

Die gefundene absolute Konfiguration des α -Hydroxyesters lässt entsprechend der Regel von PRELOG auf eine dominante Addition des GRIGNARD-Reagenzes von der si-Seite schließen (Schema 8).



Schema 8: Übergangszustand - Angriff des organischen Restes des unsymmetrischen Zinkorganyls von der si-Seite (R: Alkyl)

Nach einer Hypothese von WHITESELL [21] stehen beide Carbonylgruppen im Übergangszustand syn-coplanar zueinander. Somit ist das Metallatom in der Lage, beide Sauerstoffe zu komplexieren. Die Isopropylgruppe am C-2 des Cyclohexylrings schirmt bei Verwendung von (-)-Menthyl phenylglyoxylat die re-Seite der Carbonylgruppe ab. Der Angriff des Nucleophils erfolgt bevorzugt von der si-Seite. Mit Zunahme der raumfüllenden Eigenschaften des Nucleophils, kann die diastereofaciale Selektivität gesteigert werden.

2.2.6 (-)-8-Phenylmenthol als chirales Auxiliar

Eine Weiterentwicklung des chiralen Auxiliars (-)-Menthol (**a**) stellt das (-)-8-Phenylmenthol (**b**) dar (Abb. 4). Durch Substitution des Wasserstoffatoms der Isopropylseitenkette wurde ein überaus wirkungsvolles chirales Reagenz geschaffen. Bereits COREY und OPPOLZER nutzten (-)-8-Phenylmenthol als sehr effektives chirales Hilfsmittel in der asymmetrischen Synthese [22, 23].

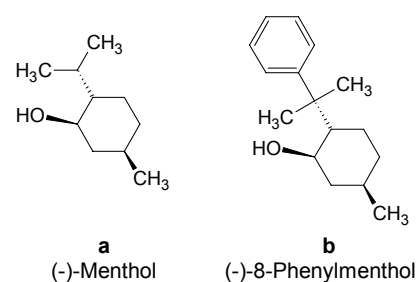


Abb. 4: Chirale Auxiliare

Gute asymmetrische Induktionen lieferten die Diels-Alder-Reaktion, Kupferaddition und intramolekulare En-Reaktion an den Acrylester (**c**, Abb. 5). Ein rigider Übergangszustand wird postuliert, indem die σ -Bindung der Esterbindung relativ fixiert ist. Dadurch wird eine Seite der π -Bindung des Acrylates abgeschirmt. WHITESELL dokumentierte einen

ähnlichen rigiden Übergangszustand für die nucleophile Addition an die Carbonylgruppe von (-)-8-Phenylmenthyl phenylglyoxylat (**d**, Abb. 5) [24].

Der Angriff des Nucleophils erfolgt bei Verwendung von (-)-8-Phenylmenthyl phenylglyoxylat in Analogie zum (-)-Menthylester (Schema 8) von der si-Seite. In Abhängigkeit der Priorität (nach CIP) des angreifenden Nucleophils und des verwendeten chiralen Alkohols lässt sich die

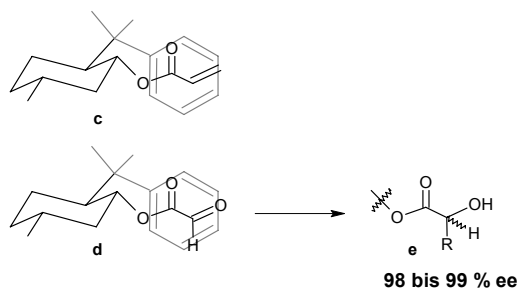


Abb. 5: Chirale Phenylmenthyl glyoxylate

Konfiguration des neu entstehenden stereogenen Zentrums kontrollieren. Unabhängig

von den raumfüllenden Eigenschaften des GRIGNARD-Reagenzes wurden gleichbleibend hohe Diastereomerenüberschüsse von 98 bis 99 % der Verbindung (**e**) erhalten (Abb. 5). Alle Reaktionen wurden in Diethylether und bei -78°C durchgeführt.

2.2.7 Derivate des (-)-8-Phenylmenthol

Um die sterischen Wechselwirkungen und die Relevanz der Phenylgruppe von (-)-8-Phenylmenthol für die Selektivität genauer erklären zu können, wurden weitere Menthylabkömmlinge durch WHITESELL et al. synthetisiert und als chirale Glyoxylsäureester einer En-Reaktion unterzogen (Abb. 6) [25].

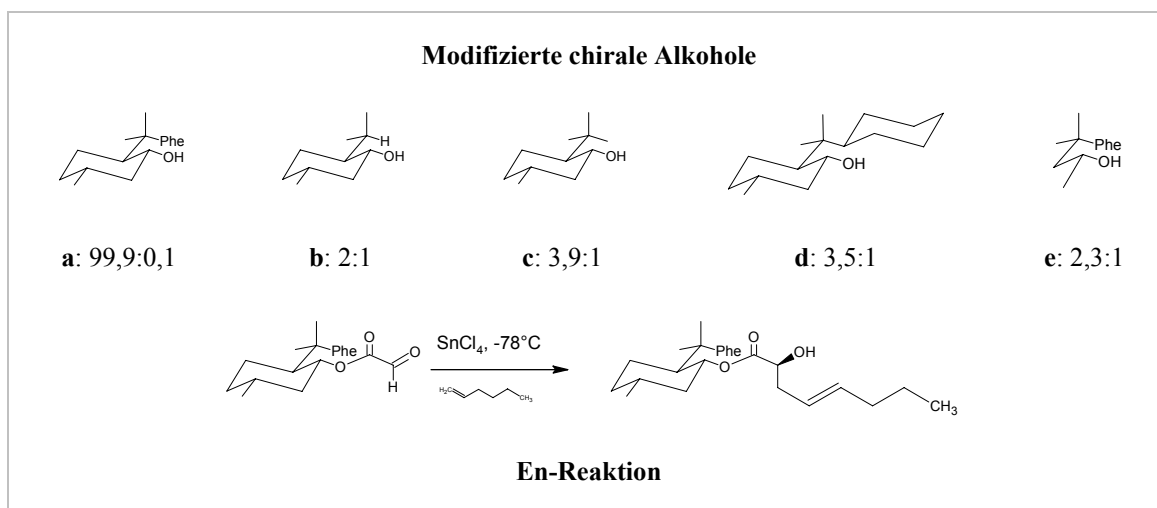


Abb. 6: Diastereomerenzusammensetzung in Abhängigkeit von modifizierten Menthyl-derivaten bei der En-Reaktion an Glyoxylaten

Die systematische Modifikation des chiralen Auxiliars zeigte, dass die Phenylgruppe für hohe Stereoselektivitäten essentiell ist. Die Substitution der Phenylgruppe durch Wasserstoff (**b**), Methyl (**c**) oder Cyclohexyl (**d**) hat eine drastische Verschlechterung der Selektivität zur Folge. Aus diesen Resultaten folgt, dass die Konformation III, trotz der sterisch günstigeren Konformationen I und II im Übergangszustand bevorzugt ist (Abb. 7). Durch π - π -Wechselwirkungen zwischen Phenylring und der mit Lewis-Säure-Katalysator komplexierten Glyoxylatbindung kann der Übergangszustand stabilisiert werden. Verbindung **e** in Abb. 6 führt wegen der Zunahme seiner Rotationsmöglichkeiten zu einer Abnahme der Selektivität. Aufbauend auf die vorliegenden Ergebnisse entwickelte KIESEWETTER unter Verwendung von (-)-8-Phenylmenthol eine stereoselektive Synthese zur Darstellung optisch aktiver Benzilsäuren. Die erzielten Reinheiten der Diastereomere der Phenylmenthyl benzilate (≤ 5 % Verunreinigung mit dem unerwünschten Diastereomer) bestätigen die Effizienz des (-)-8-Phenylmenthols als chirales Auxiliar in der stereoselektiven Synthese von α -Hydroxyestern [6].

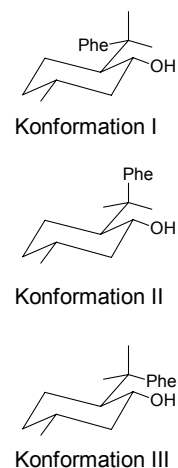


Abb. 7: Konformationen des (-)-8-Phenylmenthols

2.2.8 Zusammenfassung

Bereits vor 100 Jahren wurden erste Versuche unternommen, α -Hydroxyester enantiomerenrein darzustellen. Dazu dienten nucleophile Additionen an chiralen α -Ketoestern. Die größte Bedeutung für die diastereofaciale Selektivität kommt der chiralen Information im Alkoholrest des Esters zu. Zahlreiche chirale Alkohole wurden umfassend auf ihren Einfluss auf die chirale Induktion untersucht. Nur durch Verwendung von (-)-8-Phenylmenthol konnte unabhängig von der strukturellen Voraussetzung des angreifenden GRIGNARD-Reagenzes eine gleichbleibend hohe Stereoselektivität erzielt werden. Weiterhin kann die Stereoselektivität günstig durch niedrige Reaktionstemperaturen (-78°C), Komplexierungszusätze und zunehmenden Raumbedarf des GRIGNARD-Organyls beeinflusst werden.

3 Untersuchungen und Ergebnisse

3.1 Systematische Untersuchung der Darstellung von optisch aktiven Benzilsäureestern

3.1.1 Einleitung

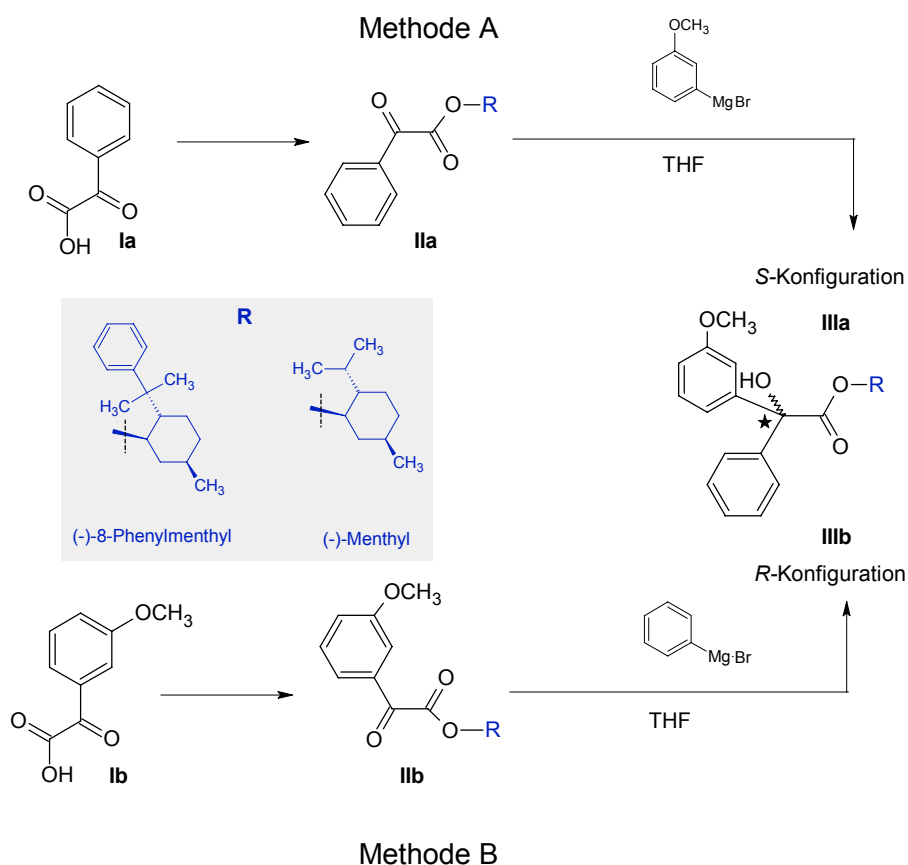
Die Darstellung racemischer kernsubstituierter Benzilate sowie deren Strukturoptimierung wurde aufgrund ihres interessanten pharmakologischen Profils ausführlich untersucht [3]. Eine weitere Optimierung und Modifizierung der Wirkqualität sowie neue Erkenntnisse zum Bindungsmechanismus könnten durch Einsatz der Enantiomere erhalten werden. Ein Ziel dieser Arbeit ist es, chirale N-Methyl-4-piperidyl benzilate mit unterschiedlichem Substitutionsmuster (Tab. 1, Kap. 1) in hoher enantiomerer Reinheit darzustellen.

Um diese Verbindungen in der angestrebten Qualität zu erhalten, wurden verschiedene Verfahren systematisch untersucht:

- ☐ stereoselektive Synthese,
- ☐ Kristallisationsmethoden,
- ☐ chromatographische Methoden,
- ☐ enzymkatalysierte Umsetzungen.

3.1.2 Untersuchungen zur Synthese

Stereoselektive Synthesen von enantiomeren Benzilsäureestern gelingen bisher ausschließlich über Addition von Metallorganen an chiralen α -Ketoestern. Den größten Einfluss auf die Selektivität der diastereofacialen Addition hat die chirale Information im alkoholischen Rest. Zahlreiche chirale Auxiliare wurden in der Vergangenheit erprobt. Als universelles und effizientes Auxiliar kann (-)-8-Phenylmenthol eingesetzt werden (Kap. 2.2.6). Für chirale Benzilsäuren etablierte KIESEWETTER eine stereoselektive Synthese unter Verwendung von (-)-8-Phenylmenthol [6, 26]. Diese soll Gegenstand weiterer Untersuchungen zur Synthese der Zielstrukturen sein (Schema 9). Durch stereoselektive GRIGNARD-Addition von substituiertem bzw. unsubstituiertem Phenylmagnesiumbromid an Phenylglyoxylsäureester (**Ia**, **Ib**) werden die diastereomeren Benzilsäureverbindungen (**IIIa**, **IIIb**) erhalten (Schema 9).



Schema 9: Darstellung von *R*- und *S*-konfigurierten Benzilsäureestern am Beispiel des 3-Methoxybenzilsäureesters **IIIa** und **IIIb**

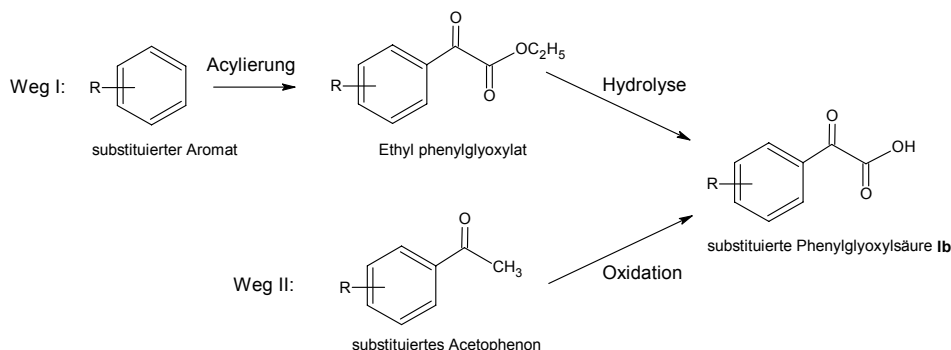
3.1.2.1 Synthese der Vorstufen

Die substituierte Phenylglyoxylsäure **Ib** ist über zwei Synthesewege zugänglich. Die Verfügbarkeit der im Handel erhältlichen Ausgangsstoffe bestimmt dabei den Syntheseweg. Durch Acylierungsreaktion (Weg I) des substituierten Aromaten oder Oxidationsreaktion (Weg II) des kernsubstituierten Acetophenons kann **Ib** dargestellt werden.

FRIEDEL-CRAFTS-Acylierungsreaktion (Weg I). Diese Acylierungsreaktion ist eine häufig genutzte Synthesemethode zur Darstellung von Aryl alkyl ketonen. Unter Verwendung von Ethoxalylchlorid lassen sich α -Ketoester darstellen. Die Synthesevorstufen **Ib** (**20**, **21**, **22**, **23**, **24**, Tab. 2) konnten auf diesem herkömmlichen Weg hergestellt werden. Die Acylierungsreaktionen wurden in Dichlormethan oder Dichlorethan durchgeführt. Als LEWIS-Säure wurde Aluminiumchlorid eingesetzt, welches mit dem Carbonylsauerstoff von Ethoxalylchlorid einen hinreichend elektrophilen Komplex bildet. Da Aluminiumchlorid die entstehende Carbonylverbindung gleichfalls komplexiert, wurden

äquimolare Mengen bzw. ein leichter Überschuss LEWIS-Säure eingesetzt. Aufgrund der Substituenteneinflüsse (+M- oder +I-Effekte) werden vor allem die ortho- und para-Position des aromatischen Systems für den elektrophilen Angriff aktiviert. Aufgrund sterischer Effekte erhält man bei der Acylierung des aromatischen Systems vorwiegend das para-Substitutionsprodukt. Isomere Verbindungen wurden bei den entstandenen Ethyl glyoxylaten beobachtet.

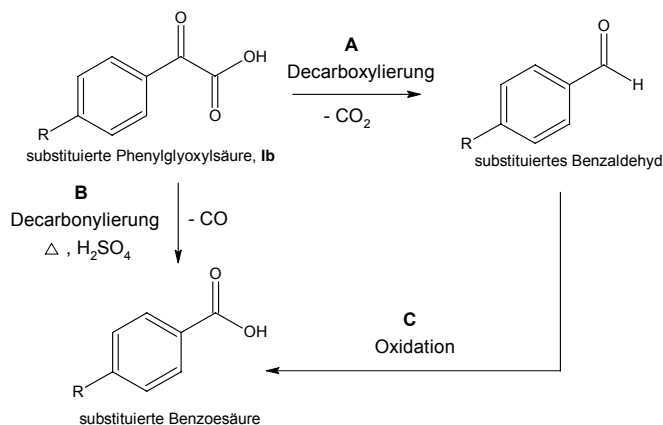
Tab. 2: Synthese substituierter Phenylglyoxylsäuren **Ib**



Verbindung Ib	R	Weg
19	<chem>CC(C)(C)C</chem>	II
20	<chem>SC</chem>	I
21	<chem>CCCCC</chem>	I
22	<chem>COCCCC</chem>	I
23	<chem>CN(C)C</chem>	I
24	<chem>OC(F)(F)F</chem>	I

Problematisch gestaltete sich die Reinigung der Ethyl phenylglyoxylate wegen isomerer Verunreinigungen. Durch Säulenchromatographie konnte in einigen Fällen eine Trennung erzielt werden. Alternativ wurde der Ethylester verseift und die Reinigung durch Kristallisation über die sehr gut kristallisierenden Phenylglyoxylsäuren vollzogen. Es wurden überwiegend moderate Ausbeuten von 50 bis 70 % der Theorie (2 Stufen: Acylierung und Esterhydrolyse) erzielt. Geringe Ausbeuten von 20 % wurden z. B. bei 4-

Trifluormethoxyphenylglyoxylsäure (**24**) gefunden, was sich folgendermaßen erklären lässt: Zum einen deaktiviert der Trifluormethoxy-Substituent (-I-Effekt > +M-Effekt) die para-Position für das angreifende elektrophile Reagenz [27, 28]. Zum anderen weist das erhaltene Endprodukt **24** im Vergleich zum Ethylester erhebliche Stabilitätsprobleme auf. Carbonsäuren, die in α -Stellung eine elektronenziehende Gruppe (Carbonylgruppe) besitzen, neigen zur Decarboxylierung (A, Schema 10). Der Trifluormethoxy-Substituent in para-Stellung von **24** verstärkt diesen Effekt mit seinen elektronenziehenden Eigenschaften und könnte eine Erklärung für die gesteigerte Instabilität sein.



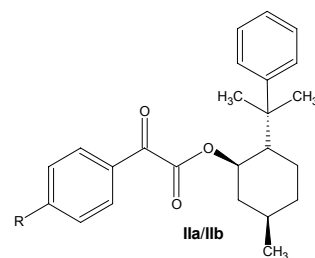
Schema 10: Mögliche Abbauwege von Phenylglyoxylsäuren

Oxidationsreaktion (Weg II, Tab. 2). Durch Oxidation der in Nachbarschaft zur Carbonylgruppe befindlichen Methylgruppe des Acetophenons mit Kaliumpermanganat konnte Verbindung **19** erhalten werden. Entsprechend den Reaktionsbedingungen von PELZER [29] wurde ein Produkt mit einem Schmelzpunkt von 169°C erhalten. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen ergaben eine einheitliche Zusammensetzung des Produktes. Durch seinen Schmelzpunkt wurde es als *tert*-Butylbenzoesäure identifiziert. Vermutlich geht dieses Produkt durch oxidative Decarboxylierung aus dem entsprechenden α -Ketoester hervor (A und C, Schema 10). Der entstandene Benzaldehyd wird sofort durch Kaliumpermanganat weiter zur Benzoesäure oxidiert. Die Reaktionsbedingungen wurden deshalb modifiziert. Statt 5 Moläquivalenten wurden 2 Moläquivalente der oxidierenden alkalischen Kaliumpermanganat-Lösung pro Moläquivalent Acetophenon verwendet und die Reaktionszeit verlängert. Unter diesen Reaktionsbedingungen wurden 48 % 4-*tert*-Butylphenylglyoxylsäure mit einem Schmelzpunkt von 69-71°C erhalten. Saure organische Verunreinigungen konnten zuvor durch fraktionierte Extraktion der wässrigen Phase bei schwach saurem pH-Wert entfernt werden.

Zur Darstellung des jeweiligen (-)-8-

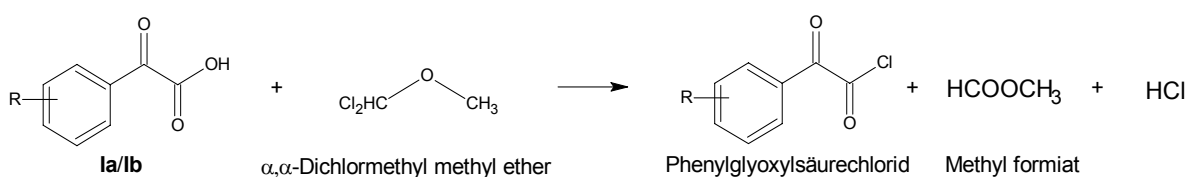
Tab. 3: (-)-8-Phenylmenthyl glyoxylate

Phenylmenthyl-/(-)-Menthyl glyoxylates (**IIa/IIb**, Schema 9, Tab. 3) wird zunächst das Phenylglyoxylsäurechlorid gebildet. OTTENHEIM nutzte α,α -Dichlormethyl methyl ether zur Darstellung von Säurechloriden der α -Ketosäuren. Die gebräuchlichen Reagenzien wie Phosphortrichlorid, Thionylchlorid, Oxalylchlorid erwiesen sich als nicht zweckmäßig und lieferten keine bis niedrige Ausbeuten der α -Ketosäurechloride [30]. Die Verbindungen **25** bis **29** konnten gewonnen werden, indem die entsprechend substituierte/unsubstituierte Phenylglyoxylsäure zuerst mit einem Moläquivalent α,α -Dichlormethyl methyl ether versetzt wurde (Schema 11).



Verbindungen IIa/IIb	R
25	H
26	
27	
28	
29	

Nach Abschluss der Reaktion wurde ohne Berücksichtigung des entstandenen Methylformiats das so erhaltene Säurechlorid zu einer Lösung von (-)-8-Phenylmenthol bei 0°C zugetropft. Nach der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches konnte der nicht umgesetzte Alkohol und die durch Hydrolyse aus dem Säurechlorid entstandene Phenylglyoxylsäure problemlos durch Säulenchromatographie entfernt werden.



Schema 11: α,α -Dichlormethyl methyl ether zur Darstellung von Säurechloriden der α -Ketosäuren

Die Phenylmenthyl glyoxylate (**IIa/IIb**) wurden in Abhängigkeit von der Qualität des Ausgangsstoffes in guten Ausbeuten bis zu 80 % der Theorie erhalten. Große Mengen an nicht umgesetztem Ausgangsstoff und ein Gemisch aus nicht identifizierbaren Produkten wurden bei dem Versuch der Umsetzung von 4-Dimethylaminophenylglyoxylsäure (**23**) mit α,α -Dichlormethyl methyl ether beobachtet. Es ist anzunehmen, dass sich eventuell das Hydrochlorid der 4-Dimethylaminophenylglyoxylsäure gebildet hat, welches aufgrund seiner schlechten Löslichkeit in Dichlormethan nicht zur Reaktion kam und/oder das entstandene Säurechlorid nicht stabil ist. Die Verwendung von Thionylchlorid in Dichlormethan, eine Methode, nach der YING [31] aus Dimethylaminobenzoesäure das Säurechlorid erhielt, führte ebenfalls nicht zum Erfolg. Bei beiden Methoden wurde durch dünnschichtchromatographische Untersuchungen ein ähnliches Produktspektrum gefunden. Eine mögliche Erklärung ist die Instabilität von α -Ketoestern im sauren Milieu, welche unter diesen Bedingungen zur Decarbonylierung neigen können (**B**, Schema 10).

4-Trifluormethoxyphenylglyoxylsäure (**24**) zeigte keine Reaktion zum Phenylmenthylester. Durch die bereits bei der Synthese festgestellte Instabilität von Verbindung **24**, war die Qualität des Ausgangsstoffes gemindert. Unter den gegebenen Reaktionsbedingungen wurde ein weiterer Abbau von **24** beobachtet (**B**, Schema 10).

3.1.2.2 Stereoselektive Addition des GRIGNARD-Reagenzes

Die absolute Konfiguration des im Verlauf der Reaktion neu entstehenden stereogenen Zentrums von **IIIa/IIIb** (Abb. 8, Schema 9) kann durch Wahl der entsprechenden Ausgangsstoffe kontrolliert werden. Die *S*-Konfiguration wird durch Zugabe des substituierten GRIGNARD-Reagenzes zum unsubstituierten Phenylglyoxylsäureester (**IIa**) (Methode A, Schema 9), die *R*-Konfiguration dagegen durch Zugabe des unsubstituierten GRIGNARD-Reagenzes zum substituierten Phenylglyoxylsäureester (**IIb**) erhalten (Methode B, Schema 9) [26]. WHITESELL zeigte, dass das GRIGNARD-Reagenz von der si-Seite

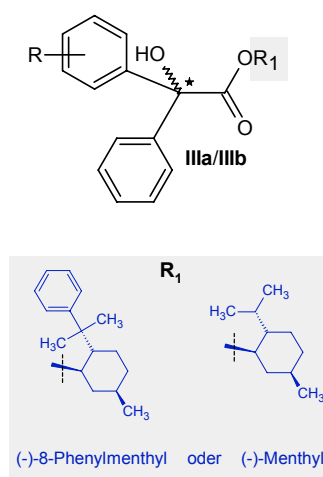


Abb. 8: (-)-Menthyl- und (-)-8-Phenylmenthyl benzilate

des (-)-8-Phenyl menthyl phenylglyoxylates (**IIa/IIb**) angreift [21]. Für die Addition von 3-Methoxyphenylmagnesiumbromid an (-)-8-Phenylmenthyl phenylglyoxylat (**IIa**) (Methode A, Schema 9) findet die si-Seiten-Addition unter der Voraussetzung statt, dass beide Carbonylgruppen sich in syn-coplanarer Stellung zueinander befinden. Durch koordinative Bindung des Magnesiums mit beiden Carbonylgruppen kann diese syn-coplanare Stellung vermutlich stabilisiert werden. Der Angriff des Nucleophils von der si-Seite unter Verwendung eines chiralen Alkohols, der in α -Stellung *R*-konfiguriert ist, und einer syn-coplanaren Stellung der Carbonylgruppen entspricht der PRELOG-Regel (Kap. 2.2.2 und Abb. 9).

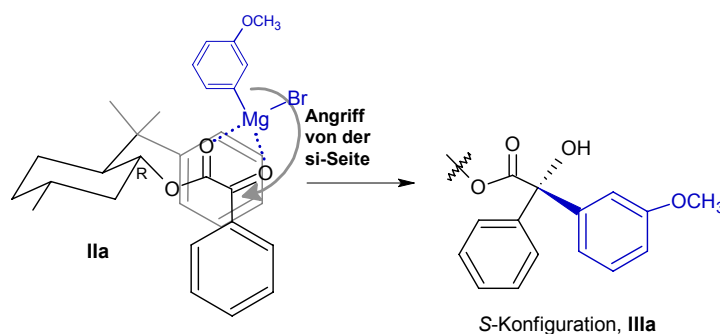


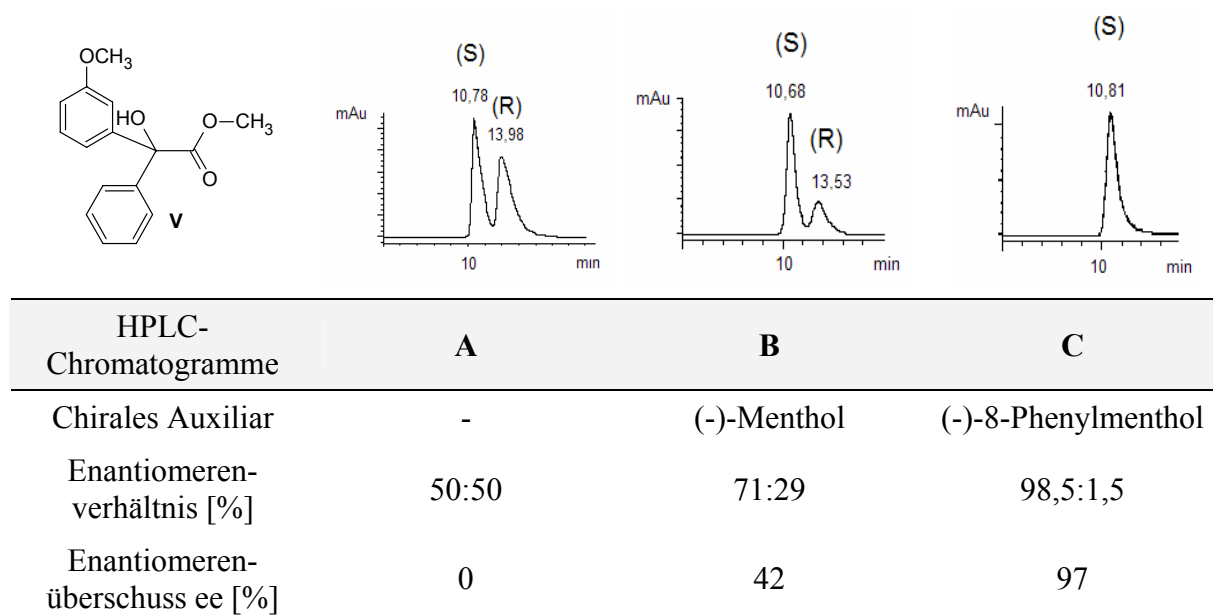
Abb. 9: Reaktionsmechanismus zur Darstellung der *S*-konfigurierten Benzilsäureester **IIIa** (Methode A, Schema 9)

Die absolute Konfiguration wird einzig durch die Priorität der Phenylringe (nach CIP) entschieden. Demnach wird die *R*-Konfiguration erhalten, wenn von der substituierten Phenylglyoxylsäure (**Ib**) ausgegangen wird (Methode B, Schema 9).

Zunächst wurden der (-)-8-Phenylmenthylester und der (-)-Menthylester der jeweiligen Phenylglyoxylsäuren (**IIa**) eingesetzt und vergleichend ihr Einfluss auf die Stereoselektivität der Addition von 3-Methoxyphenylmagnesiumbromid bestimmt. Sämtliche stereoselektiven Additionen wurden in Tetrahydrofuran bei -78°C durchgeführt. Nachfolgend waren die Verseifung des Diastereomers (**III**), die Methylierung der Benzilsäure (**IV**) sowie die Umesterung des Methylesters (**V**) zum N-Methyl-4-piperidylester (**VI**) erforderlich (vgl. Schema 12, Kap. 3.1.2.3), um den Enantiomerenüberschuss (ee) auf der Stufe des Methylesters oder des N-Methyl-4-piperidylesters durch HPLC zu ermitteln. Die Ergebnisse der stereoselektiven Addition der 3-Methoxy-Verbindung nach Methode A (Schema 9) sind Tab. 4 zu entnehmen. Wird der (-)-Menthylester der Phenylglyoxylsäure eingesetzt, ist die Stereoselektivität und die

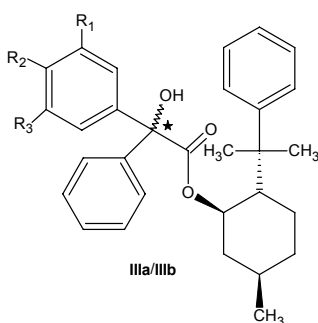
enantiomere Reinheit von 42 % ee nur gering und reiht sich damit in die Resultate von BOIREAU und WHITESELL ein. Erwartungsgemäß höher ist die enantiomere Reinheit > 98 % ee, wenn der (-)-8-Phenylmenthylester verwendet wird.

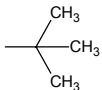
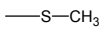
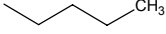
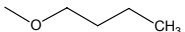
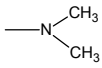
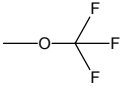




Tab. 4: HPLC-Chromatogramme zur Bestimmung der enantiomeren Reinheit von (S)-Methyl 3-methoxybenzilat (**61**) (Methode A)



Weitere diastereomere Verbindungen (Tab. 5) wurden mit (-)-8-Phenylmenthol als chiralem Hilfsmittel synthetisiert. Das Ausmaß der chiralen Induktion wurde nicht anhand der Diastereomerenverhältnisses der (-)-8-Phenylmenthyl benzilate (**IIIa/IIIb**) ermittelt, da die Bestimmung des Diastereomerenverhältnisses mittels HPLC nur für einige Diastereomere gelang. Dagegen konnte für alle enantiomeren Zielstrukturen der basischen N-Methyl-4-piperidyl benzilate eine geeignete HPLC-Methode für die Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse gefunden werden (Kap. 3.1.4.1). Auf Grundlage dieser Enantiomerenüberschüsse wurde die Stereoselektivität der nucleophilen Addition bewertet. Hierzu wurden die diastereomeren Phenylmenthylester (**IIIa/IIIb**) verseift, zum Methylester (**V**) umgesetzt und anschließend zum 4-Piperidylester (**VI**) umgeestert (vgl. Schema 12, Kap. 3.1.2.3). Eine Racemisierung und somit Verfälschung der Resultate der chiralen Induktion wurde in vorangegangenen Experimenten untersucht (Kap. 3.3) und kann unter diesen Reaktionsbedingungen ausgeschlossen werden.

Tab. 5: Resultate der asymmetrischen Induktion für ausgewählte Vertreter



R₁	R₂	R₃	<i>S</i>- Konfiguration (IIIa)*	ee [%] **	<i>R</i>- Konfiguration (IIIb)*	ee [%] **
H		H	30	>99,0 (85)	40	98,4 (78)
H		H	31	>99,0 (88)	41	>99,0 (79)
H		H	32	96,0 (63)	42	96,0 (67)
H		H	33	94,6 (72)	43	94,0 (81)
H		H	34	98,0 (86)	-	-
H		H	35	97,6 (52)	-	-
H		H	36	96,8 (65)	-	-
	H		37	96,4 (82)	-	-
H		H	38	97,0 (74)	-	-

Die diastereomeren (-)-8-Phenylmenthyl (*R*)-/(*S*)-4-methylsulfonylbenzilate **39/44** sind in der Tabelle nicht aufgeführt, da sie durch Oxidation aus den Diastereomeren **31/41** hervorgehen.

* die absolute Konfiguration bezieht sich auf das zentrale C-Atom im Benzilsäuremolekül

** in Klammern: Ausbeute in %

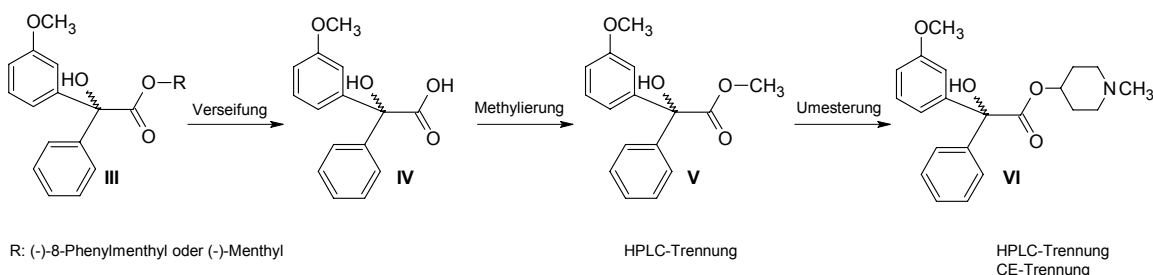
Die Resultate der asymmetrischen Synthese sind in Tab. 5 aufgeführt. Die *S*-konfigurierten Zielstrukturen, die aus Verbindungen **34** bis **38** hervorgehen und die dazu korrespondierenden *R*-Enantiomere, wurden auf alternativen Wegen (Kristallisation, chromatographische Methoden) gewonnen. Deshalb wurden an dieser Stelle nur die *S*-konfigurierten Diastereomere **34** bis **38** (**IIa**) dargestellt, um später unter Zuhilfenahme

dieser Referenzsubstanzen die absolute Konfiguration den Zielstrukturen eindeutig zuordnen zu können. Die nucleophilen Additionen verliefen vorwiegend in guten (72 bis 88 %) und selten in moderaten Ausbeuten (52 bis 67 %). Als nucleophile Reagenzien wurden die entsprechend substituierten GRIGNARD-Reagenzien verwendet, welche aus ihren analogen Arylbromiden und Magnesium in Tetrahydrofuran hergestellt wurden. Nur für die 3,5-Dimethoxy-Verbindung (**37**) wurde, da 1-Brom-3,5-dimethoxybenzen im Handel nicht erhältlich war, 3,5-Dimethoxyphenylmagnesiumchlorid als GRIGNARD-Reagenz eingesetzt. Nach Zugabe des Phenylmagnesiumbromids (Methode A, Schema 9) bzw. des substituierten Arylmagnesiumbromids (Methode B, Schema 9) zum α -Ketoester wird noch 2 h bei -78°C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung der Reaktionsmischung wird anstelle halbkonzentrierter Salzsäure 10 %ige Ammoniumchlorid-Lösung verwendet. Ansonsten ist unter diesen Bedingungen bei tertiären Alkoholen mit Dehydratisierung zu rechnen, was eine Racemisierung zur Folge hätte. Über Säulenchromatographie ließen sich die Ausgangsstoffe Säure und Phenylmenthol und geringfügige Mengen an Nebenprodukten ausnahmslos sehr gut von den Produkten (**30** bis **43**) trennen. Die gefundenen Nebenprodukte sind hauptsächlich auf unerwünschte Produkte, die bei der Bildung des GRIGNARD-Reagenzes entstehen, zurückzuführen. Bei der Darstellung von Verbindung **34** konnte die Entstehung von Nebenprodukten des GRIGNARD-Ansatzes verfolgt werden. Eine Zunahme der grünlichen Verfärbung deutete auf eine vermehrte Bildung von Kristallviolett aus 1-Brom-4-dimethylaminobenzen bzw. dessen GRIGNARD-Reagenz hin. Verstärkt wurde diese Annahme durch einen auftretenden Farbwechsel von grün nach gelb in Abhängigkeit vom pH-Wert beim Aufarbeiten des Reaktionsgemisches. Weitere Nebenprodukte können unter anderem durch Reaktion des entstandenen tertiären Alkohols mit dem GRIGNARD-Reagenz auftreten. Der Angriff des GRIGNARD-Reagenz an die Carbonylfunktion des Esters ist von geringerer Bedeutung, da die Esterfunktion von α -Ketoestern überwiegend resistent gegenüber nucleophilen Angriffen ist.

3.1.2.3 Darstellung der enantiomeren Zielstrukturen

Zur Synthese der gewünschten N-Methyl-4-piperidyl benzilate schließen sich nachfolgende Syntheseschritte an (Schema 12):

- ☐ Verseifung des Diastereomers (**III**),
- ☐ Methylierung der Benzilsäure (**IV**) und
- ☐ Umesterung des Methylesters (**V**) zum N-Methyl-4-piperidylester (**VI**).



Schema 12: Nachfolgende Syntheseschritte zum N-Methyl-4-piperidyl benzilat am Beispiel der 3-Methoxy-Verbindung

Die Hydrolyse der (-)-8-Phenylmenthyl benzilate (**III**) wurde mit Kaliumhydroxid-Lösung durchgeführt [6]. Nach zwei- bis dreistündiger Reaktion war die Hydrolyse des Esters für gewöhnlich abgeschlossen. Dagegen benötigten die *tert*-Butyl-Verbindungen **30** und **40**, sowie die n-Butyl-Verbindungen **32** und **42** 15 Stunden bis zur vollständigen Hydrolyse. Die Benzilsäuren (**IV**) **45** bis **53** wurden in Ausbeuten von 56 bis 87 % der Theorie erhalten.

Die Methoden zur Darstellung der Methylester (**V**) aus der Benzilsäure (**IV**) und die Umesterung zum N-Methyl-4-piperidylester (**VI**) wurden in der Dissertation von VORWERK [5] detailliert untersucht. Die Darstellung des Methylesters (**V**) gelingt in Anlehnung an eine Methode von PAILER und BERGTHALLER [32] durch Behandlung der Benzilsäure (**IV**) mit Dimethylsulfat in Dimethylformamid. Die synthetisierten Methylester **54** bis **62** fielen in Ausbeuten von 63 bis 90 % der Theorie an. Die anschließende Umesterung des Methylesters (**V**) zum Piperidylester (**VI**) wird in Petroleumbenzin und einem leichten Überschuss N-Methyl-4-piperidol durchgeführt [33]. Die isolierten enantiomeren N-Methyl-4-piperidylester **1** bis **18** besitzen meist gute

Kristallisationseigenschaften und gehen oft beim Verreiben mit Diethylether in den festen Zustand über. Auffällig waren jedoch die Kristallisationsunterschiede zwischen reinen Enantiomeren und Racemat. Häufig kristallisieren die Enantiomere schlechter als das Racemat. So wurden die Enantiomeren von der n-Butyl-Verbindung **3** und **4** nur als Öl erhalten, hingegen fiel das Racemat in kristalliner Form an. Die Reinigung der basischen Ester konnte aufgrund ihrer guten Kristallisationseigenschaften vorwiegend durch Kristallisation erfolgen. War eine Reinigung durch Kristallisation nicht möglich, wurden die basischen Ester über Säulenchromatographie mit n-Hexan/Ethylacetat unter 10 %igem Zusatz von ammoniakalisch gesättigtem Methanol gereinigt. Die Ausbeuten variierten von 64 bis 80 % der Theorie. Entstehende Nebenprodukte, die für eine Minderung der Ausbeute verantwortlich sind, konnten dünnschichtchromatographisch identifiziert werden und decken sich mit den Beobachtungen von VORWERK [5]. Zum einen handelt es sich um die Benzilsäure, welche aus dem Methylester hervorgeht und durch gleiche Färbungen beim Besprühen mit Schwefelsäure gekennzeichnet ist. Zum anderen entsteht durch oxidative Decarboxylierung Benzophenon.

3.1.2.4 Darstellung racemischer N-Methyl-4-piperidyl benzilate

Neben den enantiomeren Zielstrukturen (Tab. 1) wurden die Racemate der substituierten N-Methyl-4-piperidyl benzilate synthetisiert. Eine schnelle, kostengünstige und vielseitig einsetzbare Methode ist die GRIGNARD-Addition an den Methylester der Phenylglyoxylsäure, welche das racemische Methyl benzilat **72** bis **80** lieferte. Die Reaktionen wurden in Tetrahydrofuran durchgeführt. Nach dem Zutropfen des GRIGNARD-Reagenzes wurde noch 1,5 bis 2 h erhitzt. Die Ausbeuten lagen zwischen 52 und 85 % der Theorie. Ausnahme bildet hier die Dimethylamino-Verbindung (**66**) mit nur 21 % Ausbeute. Um die vermehrte Bildung von Farbstoff zu verhindern, wird das GRIGNARD-Reagenz bei 0°C zugegeben, eine Stunde bei Eiskühlung und dann 0,5 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Vorsicht unterliegen Reaktionen mit GRIGNARD-Reagenzien, die aus 4-Trifluormethylphenylbromid hergestellt werden, da hier mit Explosionsgefahr zu rechnen ist [34]. Die Reaktionen sollten daher mit kleinen Mengen und bei guter Eiskühlung durchgeführt werden.

Die Reinigung der racemischen Methyl benzilate wurde überwiegend durch Säulenchromatographie vollzogen, in seltenen Fällen, wie bei Verbindung **66**, über

Kristallisation. Die darauf folgende Umesterung zum racemischen N-Methyl-4-piperidyl benzilat entspricht der Vorschrift und den Beobachtungen aus Kap. 3.1.2.3.

3.1.2.5 Diskussion

Die stereoselektive Synthese bietet einen verlässlichen Zugang zu den Zielstrukturen in guter bis hoher enantiomerer Reinheit. Zudem werden Schwierigkeiten bei der Bestimmung der absoluten Konfiguration vermieden, da aus dem Syntheseweg (Methode A oder B, Schema 10) die absolute Konfiguration der synthetisierten Verbindung hervorgeht. Enantiomere Verunreinigungen von bis zu 2 % müssen einkalkuliert werden.

Durchführbarkeit. Die Anwendbarkeit der stereoselektiven Synthese entsprechend der Methoden A und B (Schema 9, Kap. 3.1.2) auf verschiedene Substitutionsmuster der N-Methyl-4-piperidyl benzilate wird eingeschränkt durch:

- ☐ die Synthese der Vorstufen (substituierte Phenylglyoxylsäuren),
- ☐ die Erzeugung von GRIGNARD-Reagenzien aus den substituierten Arylhalogeniden (Deaktivierung des Aromaten durch die Substituenten) und
- ☐ die nötige Reaktionsträgheit der Substituenten des Aromaten gegenüber GRIGNARD-Reagenzien.

Die substituierten Phenylglyoxylsäuren sind Vorstufen für die Darstellung der *R*-konfigurierten Benzilsäure (Methode B) und wurden überwiegend durch FRIEDEL-CRAFTS-Acylierung dargestellt. Die Grenzen der stereoselektiven Synthese zeichnen sich bereits hier ab. Der Einfluss des Erstsubstituenten des aromatischen Systems lässt sich weitgehend durch elektronische Effekte begründen. Darüber hinaus spielen sterische Faktoren eine Rolle, die sich nur auf die ortho-Position auswirken. Elektronenziehende Substituenten wie Trifluormethoxy-Gruppen deaktivieren das aromatische System für das angreifende elektrophile Reagenz. Neben den verzeichneten geringen Ausbeuten, führen elektronenziehende Substituenten zu Stabilitätsproblemen der Phenylglyoxylsäure, was sich nachhaltig auf anschließende Reaktionen auswirkt. Stark deaktivierende, meta-dirigierende Substituenten (Trifluormethyl-, Nitrogruppen) können nach FRIEDEL-CRAFTS nicht acyliert werden. Sollte die Darstellung der substituierten Phenylglyoxylsäure nicht gelingen und damit die *R*-Enantiomere (Methode B) nicht zugänglich sein, kann auf eine Variation der stereoselektiven Synthese ausgewichen werden. Wird das chirale Reagenz

(+)-8-Phenylmenthol verwendet, kann nach Methode A das *R*-Enantiomer erhalten werden, jedoch nur unter der Voraussetzung, dass sich das GRIGNARD-Reagenz aus dem substituierten Arylhalogenid erzeugen lässt.

Im Syntheseschritt der stereoselektiven nucleophilen Addition hängen die Durchführbarkeit und der Ausbeuten entscheidend von den verwendeten GRIGNARD-Reagenzien ab. Die Erzeugung der GRIGNARD-Reagenzien sowie die Reaktivität der Reagenzien werden durch die Substituenten maßgeblich beeinflusst. Die eingesetzten Substituenten wie Alkoxy-, Amino-, Methylmercapto- und Alkyl- sind in der Lage, den aromatischen Ring für den nucleophilen Angriff stark bis mäßig zu aktivieren. Dagegen machen sich die elektronenziehenden und somit deaktivierenden Eigenschaften von den Trifluormethyl- und Trifluormethoxy-Substituenten bei der Bildung des GRIGNARD-Reagenzes und den Ausbeuten der GRIGNARD-Reaktion mit 52 % und 65 % bemerkbar. Ein limitierender Faktor für das gewünschte Substituentenmuster in den Zielstrukturen ist somit die Bildung des GRIGNARD-Reagenzes (Methode A) bzw. eine Reaktionsträgheit der Substituenten gegenüber GRIGNARD-Reagenzien (Methode B). Sind diese Voraussetzungen nicht erfüllt, müssen entsprechende Ausgangsverbindungen gefunden werden, die in weiteren Syntheseschritten zum gewünschten Substituenten umgewandelt werden. So wurden die Methylsulfonyl-Verbindungen **39** und **44** aus den entsprechenden Methylmercapto-Verbindungen durch Oxidation in 86 %iger Ausbeute erhalten.

Stereoselektivität. In orientierenden Untersuchungen zur stereoselektiven GRIGNARD-Addition sollte die Notwendigkeit des (-)-8-Phenylmenthols als chirales Auxiliar überprüft werden. Die Resultate der asymmetrischen Induktion (Tab. 4) zeigen deutlich die Unentbehrlichkeit des (-)-8-Phenylmenthols und bestätigen die vorliegenden Erfahrungen [20, 22, 23, 25]. Die in Tab. 5 beschriebenen Ergebnisse der asymmetrischen Induktion belegen, dass hohe enantiomere Reinheiten (94,0 bis 99,0 % ee) erreicht werden können. Der positive Einfluss voluminöser GRIGNARD-Reagenzien auf die asymmetrische Induktion wurde in Kap. 2.2 beschrieben. Dahingehend lässt sich vermuten, dass arylsubstituierte GRIGNARD-Reagenzien angesichts der größeren räumlichen Ausdehnung selektiver von der si-Seite angreifen als das unsubstituierte Phenylmagnesiumbromid. Infolgedessen müsste Methode A (*S*-Enantiomere) höhere ee als Methode B (*R*-Enantiomere) erwarten lassen. Dies lässt sich jedoch nicht bestätigen. Lediglich eine Tendenz, die sich in zwei Werten (**40** und **43**, Tab. 5) widerspiegelt, wurde beobachtet. In den durchgeführten Experimenten wurde nur Tetrahydrofuran als Lösungsmittel

eingesetzt. Obwohl der Einfluss des Lösungsmittels eine untergeordnete Rolle für die chirale Induktion spielt, birgt Tetrahydrofuran als Lösungsmittel der Theorie nach gegenüber Diethylether Vorteile. Das nucleophile Lösungsmittel wird selbst komplex an das Magnesiumatom gebunden. Im stärker basischen Tetrahydrofuran wird die Assoziatbildung von GRIGNARD-Molekülen vermehrt zurückgedrängt. ASHBY und MEYERS zeigten, dass sich monomere GRIGNARD-Reagenzien, komplexiert mit Lösungsmittel oder anderen Coreaktanten, positiv auf die Selektivität auswirken [17, 18].

Die Reaktionen: Hydrolyse des Phenylmenthylesters (**III**), Umsetzung der Benzilsäure (**IV**) zum Methylester (**V**) und anschließende Umesterung des Methylesters zu den enantiomeren Zielstrukturen des N-Methyl-4-piperidylester (**VI**) sind gebräuchliche Methoden für derartige Reaktionsschritte. Die Anwendbarkeit dieser Methoden ist jedoch erst dadurch gegeben, dass eine Racemisierung des zentralen asymmetrischen C-Atoms des Benzilsäuremoleküls unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen nicht stattfindet.

3.1.3 Kristallisationsmethoden

Kristallisationsmethoden können zu einer Racematspaltung, d. h. Trennung des Racemates in seine zwei Enantiomere, führen. Die Racematspaltung kann durch rein physikalische Methoden oder chemische Reaktionen vollzogen werden.

3.1.3.1 Trennung der Enantiomere durch physikalische Methoden

Enantiomere lassen sich unter bestimmten Bedingungen aus einer racemischen Lösung durch Kristallisation ohne chirale Trennungsreagenzien gewinnen. Eine unabdingbare Voraussetzung dafür ist, dass das Racemat ein Konglomerat unter den Bedingungen der Kristallisation darstellt [35]. Handelt es sich bei der Racemform hingegen um eine racemische Verbindung oder ein Pseudoracemat, lässt sich eine derartige Kristallisationsmethode nicht durchführen.

Bestimmung der Racemform. Ein Konglomerat liegt vor, wenn beide Enantiomere getrennt auskristallisieren. Jeder Kristall ist aus homochiralen Molekülen aufgebaut. Ein eutektischer Punkt wird bei einer Enantiomerenzusammensetzung von 1:1 (Racemat) beobachtet. Häufiger anzutreffen sind racemische Verbindungen. Jeder Kristall enthält in

der Elementarzelle beide Enantiomere im Verhältnis 1:1. Eine racemische Verbindung kann einen höheren, tieferen oder gleichen Schmelzpunkt im Vergleich zum reinen Enantiomer aufweisen. Als eigenständige Verbindung unterscheiden sich racemische Verbindungen in vielen physikalischen Eigenschaften von den reinen Enantiomeren. Besteht das Racemat aus einer einzigen homogenen festen Phase, in der beide Enantiomere in einem Verhältnis von 1:1 in ungeordneter Form in Mischkristallen vorliegen, spricht man von Pseudoracematen [36].

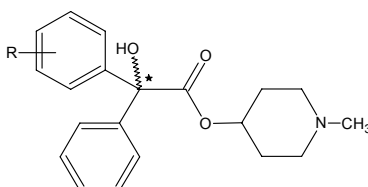
Ein Vergleich der Schmelzpunkte der Racemate und der Enantiomere der N-Methyl-4-piperidyl benzilate gibt einen ersten Anhaltspunkt darüber, welche Racemform vorliegen könnte. Liegt der Schmelzpunkt der Enantiomere 25°C über dem Schmelzpunkt des Racemates [37], ist die Wahrscheinlichkeit einer Konglomeratformation hoch. Unterschiede von 20°C und weniger sind ebenfalls anzutreffen. Ist der Schmelzpunkt des Racemates höher als der Schmelzpunkt der Enantiomere kann ein Konglomerat ausgeschlossen werden.

Einen Überblick über die Schmelzpunkte von Racemat und Enantiomeren gibt Tab. 6. Aufgrund der guten Kristallisationseigenschaften der N-Methyl-4-piperidyl benzilate in Diethylether, wurden alle Verbindungen aus Tab. 6 aus Diethylether auskristallisiert.

Von den untersuchten Verbindungen zeigen drei Racemate einen niedrigeren Schmelzpunkt als ihre Enantiomere und stellen somit potenzielle Konglomerate dar (Tab. 6, fett hervorgehoben). Eine Methode, um die Racemform eindeutig zu bestimmen, ist ein binäres Phasendiagramm. Darin wird die Abhängigkeit der Schmelztemperatur von der enantiomeren Zusammensetzung dargestellt. Für verschiedene Vertreter wurden binäre Phasendiagramme aufgenommen (Abb. 10). Hierzu wurden acht Lösungen mit unterschiedlichen Anteilen von *R*- und *S*-Enantiomer im Bereich von 100/0 bis 50/50 (*R*-Enantiomer/*S*-Enantiomer) in Diethylether hergestellt. Bei Raumtemperatur kristallisierten die Verbindungen, bestehend aus verschiedenen Anteilen an *R*- und *S*-Enantiomeren, aus den etherischen Lösungen aus. Die Schmelzpunkte wurden ermittelt. Mit Zunahme des *S*-Enantiomerenanteils (erhöhte enantiomere Verunreinigung) vergrößerte sich der Schmelzbereich. An dieser Stelle wurde der Mittelwert des Schmelzbereiches für die Datenauswertung verwendet. Die exakten prozentualen Anteile der Enantiomere wurden anschließend mittels HPLC bestimmt und gegen den Schmelzpunkt grafisch aufgetragen. Da Enantiomere gleiche physikalisch-chemische Eigenschaften mit

Ausnahme der optischen Aktivität aufweisen, wurden identische Schmelztemperaturen für eine Enantiomerenzusammensetzung von beispielsweise 60/40 (*R/S*) und 40/60 (*R/S*) angenommen.

Tab. 6: Schmelzpunkte der Racemate und Enantiomere von N-Methyl-4-piperidyl benzilaten



Substitution R	Schmelzpunkt in °C*		Racemform
	Racemat	Enantiomer	
4-tert-Butyl-	124	144	Racemische Verbindung
4-Methylsulfonyl-	141-143	135	Racemische Verbindung
4-Trifluormethoxy-	113	100	Racemische Verbindung
4-Trifluormethyl-	115-119	135	Racemische Verbindung
	(HCl: 195-198)	(HCl: 182-190)	
3-Methoxy-	100-101	118-120	Konglomerat
3,5-Dimethoxy-	136-137	85	Racemische Verbindung
4-n-Butyl-	88 (Aceton)	helles Öl	Racemische Verbindung
4-Butoxy-	125	85-86	Racemische Verbindung
4-Dimethylamino-	129-132	120	Racemische Verbindung

* aus Diethylether auskristallisiert

Bei der Auswertung der Phasendiagramme erwies sich überraschend (*R,S*)-N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (**79**) als Konglomerat (Abb. 10, Diagramm A). Der Verlauf des binären Phasendiagramms für **79** (Diagramm A, Abb. 10) lässt sich wie folgt interpretieren: Die Kurve beginnt bei 0 % *S*-Enantiomer, 100 % *R*-Enantiomer und einer Schmelztemperatur von 119°C. Mit Zunahme der *S*-enantiomeren Verunreinigung sinkt der Schmelzpunkt. Ein Minimum der Schmelztemperatur (100,5°C), die so genannte eutektische Temperatur, ist bei einer Zusammensetzung der Enantiomere von 50/50 (*R/S*) erreicht. Durch eine zunehmende *S*-enantiomere Verunreinigung wird die Gitterstruktur gestört. Die Gitterordnung (Zunahme der Entropie) und die Bindungskräfte zwischen den

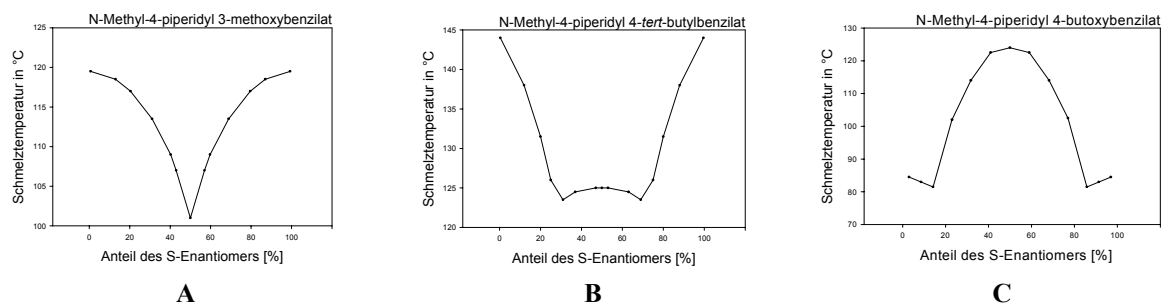


Abb. 10: Binäres Phasendiagramm eines Konglomerates (A) und racemischer Verbindungen (B) und (C)

Gitterbausteinen nehmen ab. Wird die eutektische Temperatur überschritten, kommt es erneut zu einem Anstieg der Schmelztemperatur bis auf 119°C. Die *R*-enantiomere Verunreinigung nimmt ab, die Bindungskräfte nehmen zu, die Gitterbausteine werden effizienter gepackt. Zusätzlich wurde die Konglomeratformation bestätigt, indem kleinste Mengen eines Enantiomers zum Racemat zugemischt wurden. Dabei wurde eine sofortige Schmelzpunkterhöhung im Vergleich zum Racemat beobachtet, was ein Charakteristikum für Konglomerate ist.

Das Diagramm des N-Methyl-4-piperidyl 4-*tert*-butylbenzilat (**72**) lässt wie bei **79** zunächst ebenfalls ein Konglomerat erwarten, da der Wert des enantiomeren Schmelzpunktes (144°C) gegenüber dem des Racemates (124°C) um 20°C höher lag (Diagramm **B**). Wird dem reinen *R*-Enantiomer (144°C) das *S*-Enantiomer beigemischt, wird zunächst eine Schmelzpunkterniedrigung bis auf 123,5°C bei ca. 30 % *S*-Enantiomerenanteil beobachtet (Verunreinigung des Enantiomers mit racemischer Verbindung). Bei weiterem Zumischen des *S*-Enantiomers (Anteil > 30 %) wird wieder ein Anstieg der Schmelztemperatur auf 124°C verzeichnet (Abnahme der enantiomeren Verunreinigung der racemischen Verbindung). Dieser Hinweis auf eine racemische Verbindung erhärtet sich, wenn kleinste zugemischte Mengen eines Enantiomers zum Racemat eine sofortige Schmelzpunkterniedrigung bewirken. Im Diagramm **B** sind zwei eutektische Punkte zu finden, wie sie bei racemischen Verbindungen anzutreffen sind.

Für die Verbindung N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethylbenzilat (**77**) wurde auf die Aufnahme eines binären Phasendiagramms verzichtet. Trotz der bei einer Konglomeratformation vorhandenen großen Differenz zwischen den Schmelztemperaturen von Enantiomer (135°C) und Racemat (105 bis 119°C) wurde bei dem Versuch, kleinste

Mengen Enantiomer zum Racemat zu zumischen, eine Schmelzpunktniedrigung beobachtet. Damit handelt es sich um eine racemische Verbindung, bei der der Schmelzpunkt der reinen Enantiomere höher ist als der des Racemates. Auch die Bildung des Hydrochlorids der Base von **77** führte nicht zum Konglomerat. Anhand des Schmelzpunktes von Racemat und Enantiomer des Hydrochlorids lässt sich sofort ein Konglomerat ausschließen.

Ein typisches binäres Phasendiagramm für eine racemische Verbindung, in welchem dem Racemat ein höherer Schmelzpunkt als den reinen Enantiomeren zukommt, ist in Diagramm C für N-Methyl-4-piperidyl 4-butoxybenzilat (**74**) abgebildet.

Die Verbindungen 4-Methylsulfonyl- (**80**), 4-Trifluormethoxy- (**76**), 3,5-Dimethoxy- (**78**), 4-n-Butyl- (**73**), 4-Butoxy- (**74**) und 4-Dimethylamino- (**75**) zeigen von vornherein für die Racemate höhere Schmelztemperaturen (Tab. 6). Somit sind Konglomeratformationen ausgeschlossen und demzufolge wurden keine Phasendiagramme aufgenommen. Bei diesen Verbindungen kann es sich um Pseudoracemate oder racemische Verbindungen handeln. Da Pseudoracemate keine große Differenz der Schmelztemperaturen zwischen Racemat und Enantiomer aufzeigen, sind bei den oben genannten Verbindungen ebenfalls racemische Verbindungen anzunehmen.

Racemattrennung. Die Voraussetzung eines Konglomerates für eine physikalische Trennung ohne chirale Trennreagenzien (manuelle Trennung, Vorzugskristallisation) ist bei (*R,S*)-N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (**79**) gegeben. Aus einer etherischen Lösung kristallisiert das Konglomerat von **79** langsam bei Raumtemperatur aus. Jedoch konnte keine genaue Aussage darüber getroffen werden, ob enantiomorphe Kristalle mit erkennbaren Unterschieden in der Kristallform vorliegen. Somit war eine manuelle Trennung durch Auslese der enantiomorphen Kristalle aufgrund verschiedener Kristallformen nicht möglich.

Durch Vorzugskristallisation konnte die Racematspaltung vollzogen werden. Dazu wurde ein Impfkristall des synthetisierten *S*-Enantiomers für (*R,S*)-N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (**79**) in Diethylether herangezogen. Es wird eine gesättigte Lösung des Racemates (**79**) in Diethylether hergestellt. Der Impfkristall (*S*-Enantiomers) wird zur gesättigten Lösung hinzugegeben. Nach Beendigung des Kristallwachstums wird der Kristall manuell entfernt und der Enantiomerenüberschuss der Lösung mittels HPLC ermittelt. Der verbliebene Anteil des *S*-Enantiomers in der Lösung betrug 5 %, der des

Kristalls > 98 %. Durch Verwendung eines enantiomorphen Kristalls des *R*-Enantiomers als Impfkristall, kann aus der mit 95 % *R*-Enantiomer angereicherten Lösung das *R*-Enantiomer bevorzugt auskristallisiert werden. Somit gelingt die stufenweise Trennung des Racemates (79).

3.1.3.2 Chemische Trennung der Enantiomere über Diastereomere

Durch Überführung der Racemate in Diastereomerengemische können die unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften der Diastereomere zur indirekten Racematspaltung ausgenutzt werden. Im Fall der fraktionierten Kristallisation beruht die Trennung auf unterschiedlichen Löslichkeiten der entsprechenden Feststoffe in einem bestimmten Lösungsmittel.

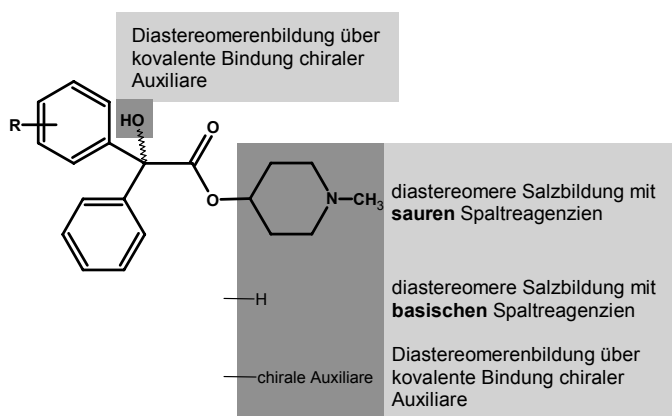


Abb. 11: Modifikationsmöglichkeiten chiraler Benzilate

Für eine Diastereomerenbildung ergeben sich folgende Ansatzpunkte:

- ☐ Diastereomere Salzbildung
 - basische Piperidyl benzilate mit sauren Spaltreagenzien
 - Benzilsäure mit basischen Spaltreagenzien
- ☐ Diastereomere Derivatbildung durch Variation der Alkoholkomponente des Esterrestes
- ☐ Diastereomere Derivatbildung an der tertiären Alkoholgruppe
 - Veresterung mit Phthalsäure und anschließende Trennung mit basischen Spaltreagenzien

- Veresterung mit optisch aktiven Säuren
- Darstellung von Acetalen mit optisch aktiven Aldehyden.

Die Derivatbildung an der tertiären Alkoholgruppe mit chiralen Auxiliaren wird für die Untersuchungen nicht in Betracht gezogen. Die tertiäre Alkoholgruppe ist aufgrund ihrer sterisch anspruchsvollen Gruppen und zugleich geringen Reaktivität für Reaktionen nur bedingt geeignet. Die direkte Veresterung der Säure mit tertiären Alkoholen gelingt nur mit sehr niedrigen Ausbeuten. Nach einer erfolgten Diastereomerentrennung wäre die Wiederherstellung des tertiären Alkohols durch Verseifen im gleichen Maße erschwert. Wesentlich aussichtsreicher ist die Modifikation der Alkoholkomponente des Esterrestes. In diesem Zusammenhang wurden die (-)-Menthyl- und (-)-8-Phenylmenthylester der Benzilate genauer betrachtet. Allerdings zeigten diese keine guten Kristallisationseigenschaften und sind deshalb für die fraktionierte Kristallisation ungeeignet. Demzufolge wurde der Schwerpunkt der Racematspaltung auf die diastereomere Salzbildung gelegt. Am Beispiel von (*R,S*)-*N*-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (**79**) wurden verschiedene chirale Trennreagenzien für Basen wie Campher-10-sulfonsäure, Äpfelsäure, Mandelsäure, 1,1'-Binaphthyl-2,2'-diyl hydrogenphosphat, Weinsäure und Derivate der Weinsäure (O,O'-Di-*p*-toluoylweinsäure, O,O'-Di-*p*-anisoylweinsäure [38]) getestet. Hierbei wurde zur Lösung der racemischen Base ein Moläquivalent der chiralen Säure in einem geeigneten Lösungsmittel hinzugegeben. Nach der Aufarbeitung des diastereomeren Salzes wurde der Enantiomerenüberschuss via HPLC bestimmt. Eine Racemattrennung von (*R,S*)-*N*-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat gelingt nur mit O,O'-Di-*p*-toluoylweinsäure in Methanol. (+)-*N*-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (**15**) bildete dabei bevorzugt mit (+)-O,O'-Di-*p*-toluoylweinsäure ein Salz und entsprechend (-)-*N*-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (**16**) mit (-)-O,O'-Di-*p*-toluoylweinsäure. Durch Verwendung von Substanzfamilien, d. h. einer Mischung aus verschiedenen Weinsäurederivaten, konnte das Verfahren effizienter gestaltet werden. VRIES et al. erzielten gute Erfolge durch gleichzeitige Zugabe mehrerer Spaltreagenzien einer Familie (im Allgemeinen strukturell ähnlich aufgebaut) zum Racemat [39]. Verschiedene Gemische aus Dibenzoylweinsäure (T1), Di-*p*-toluoylweinsäure (T2), Di-*p*-anisoylweinsäure (T3) wurden zur Racemattrennung untersucht.

Tab. 7: Racemattrennung mittels Substanzfamilien

Verhältnis der Weinsäuren* T1/T2/T3	Anzahl der Umkristallisationen	Enantiomerenverhältnis [%]
1:3:1,5	6	10:90
1:7:3	10	4:96
1:10:4	7	1:99
1:10:0	3	1:99

* Dibenzoylweinsäure (T1), Di-p-toluoylweinsäure (T2), Di-p-anisoylweinsäure (T3)

Das Optimum wurde bei einer Mischung aus nur zwei Weinsäurederivaten (O,O'-Dibenzoylweinsäure/O,O'-Di-p-toluoylweinsäure 1:10) gefunden. Das häufige Umkristallisieren des Salzes (7-8mal) gemäß der klassischen Methode nach PASTEUR konnte mit der Verwendung von einer Weinsäuremischung auf 2-3maliges Umkristallisieren reduziert werden (Abb. 12). Das gebildete diastereomere Salz setzte sich aus der Base und beiden Weinsäurederivaten (T1 und T2) zusammen, was auch nach mehrmaligem Umkristallisieren erhalten blieb (NMR-spektroskopisch ermittelt).

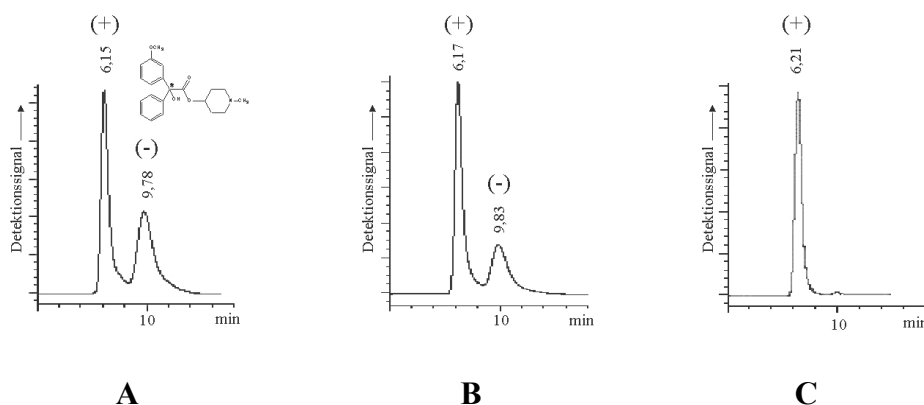
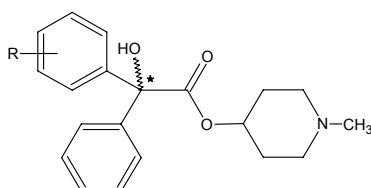


Abb. 12: HPLC-Chromatogramme nach ein- (A), zwei- (B) und dreimaliger (C) fraktionierter Kristallisation von (+)-(R)-N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (**15**) mit einer Mischung aus Weinsäurederivaten

Weitere Racemate der N-Methyl-4-piperidyl benzilate wurden wie in der oben beschriebenen Methode in folgenden Lösungsmitteln untersucht: Methanol, Ethanol, Isopropanol, Ethyl acetat, Aceton, Ethyl methyl keton, Isobutyl methyl keton. Eine Übersicht zu den untersuchten Verbindungen gibt Tab. 8. Die Zuordnung der absoluten Konfiguration erfolgte mittels HPLC (Kap. 3.1.4.1) durch das adäquate S-Enantiomer, dessen Konfiguration durch die stereoselektive Synthese nach Methode A festgelegt ist.

Für die Racematspaltung der Benzilsäuren wurde die nachstehende Auswahl von Trennreagenzien geprüft: Ephedrin, D-Glucosamin, Brucin, (*S*)- α -Methylbenzylamin, Cinchonidin/Cinchonin und Chinidin/Chinin, mit dem COHEN [40] die Racemattrennung von 4-Nitrobenzilsäure gelang. Zur Lösung der racemischen Säure wurde ein Moläquivalent der chiralen Base in den oben genannten Lösungsmittel hinzugegeben. Vielfache Kristallisationsversuche führten nicht zum Erfolg. Die Trennungen scheiterten bereits an einer nicht erfolgten Salzbildung.

Tab. 8: Fraktionierte Kristallisation mit Weinsäurederivaten (O,O'-Dibenzoylweinsäure/ O,O'-Di-p-toluoylweinsäure 1:10)



Substitution R	Lösungsmittel	ee [%]		
		R-Enantiomer	S-Enantiomer	
4-Trifluormethyl-	Diethylether/Methanol	98	98	(2-3)*
3-Methoxy-	Methanol	95	95	(3)*
3,5-Dimethoxy-	Isobutylethylketon	95	99	(4)*
4- <i>tert</i> -Butyl-	Isopropanol	Salzbildung ohne Enantiomerenanreicherung		
4-Methylsulfonyl-	Ethanol			
4-Trifluormethoxy-	Aceton			
4-Dimethylamino-	-	keine Salzbildung		

* Anzahl der Umkristallisationen

3.1.3.3 Diskussion

In seltenen Fällen kristallisieren die Enantiomere eines Racemates in enantiomorphen Kristallen getrennt voneinander aus und lassen auf diese Weise eine Racematspaltung ohne chirale Trennreagenzien zu. Dieses Phänomen wurde bereits von PASTEUR beobachtet. Ihm gelang durch Auslese enantiomorpher Kristalle die Trennung von Weinsäuresalzen [41]. Bisher wurden nur einige Hunderte Konglomerate in der Literatur beschrieben [42]. Es wird vermutet, dass mehr als 90 % der chiralen Feststoffe in heterochiralen Packungen auftreten.

Racemform und Aussagen zu intermolekularen Bindungskräften. Durch Bestimmung der Racemform mittels binärem Phasendiagramm (Diagramm A, Abb. 10) konnte die Verbindung **79** eindeutig den Konglomeraten zugeordnet werden. Die restlichen untersuchten Verbindungen sind racemische Verbindungen. Pseudoracemate befinden sich vermutlich nicht darunter.

Durch den Verlauf des binären Phasendiagramms sind Aussagen über die Kräfte zwischen den Gitterbausteinen im Kristallgitter möglich. Die Wärme, die beim Schmelzen (Schmelzenthalpie) zugeführt wird, korreliert mit den Bindungskräften zwischen den einzelnen Gitterbausteinen. Je stabiler die Koordinationsgitterstruktur (hohe Gitterenergie), desto höher ist die Schmelztemperatur. Der Schmelzvorgang ist ein endothermer Vorgang. Erst bei genügend hohen Temperaturen überwiegt der Entropieterm ($-T\Delta S$) und ein positiver ΔH -Wert wird kompensiert. Ein endothermer Vorgang verläuft dann exergonisch (Gibbs-Helmholtz-Gleichung: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). Übertragen auf (*R,S*)-N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (**79**) muss dies zwangsläufig bedeuten, dass zwischen gleichen Enantiomeren eine bevorzugte Anziehung besteht. Dies führt zu einer stabileren Gitterstruktur gleicher Enantiomere gegenüber gegensätzlichen Enantiomeren. Dies spiegelt sich in einem höheren enantiomeren Schmelzpunkt gegenüber dem racemischen Schmelzpunkt wider. Bevorzugte Wechselwirkungen gegensätzlicher Enantiomere finden wir beispielsweise bei (*R,S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-butoxybenzilat (**65**). Das Racemat ist im Vergleich zum Enantiomer durch einen höheren Schmelzpunkt gekennzeichnet. Hingegen würden bei Pseudoracematen nur geringe Affinitätsunterschiede zwischen gleichen und entgegengesetzten Molekülen anzutreffen sein. Der Schmelzpunkt des Pseudoracemates entspricht mit möglicher geringer Abweichung dem der reinen Enantiomere und ist innerhalb der untersuchten Substanzen nicht anzutreffen.

Racemische Verbindungen der N-Methyl-4-piperidyl benzilate können im Vergleich zu den Enantiomeren als eigenständige Verbindungen aufgefasst werden. Der Einfluss der enantiomeren Verunreinigung auf physikalisch-chemische Eigenschaften der racemischen Verbindungen wie dem Schmelzpunkt wurde für die Klasse der N-Methyl-4-piperidyl benzilate nachgewiesen. Desweiteren wurden in orientierenden Untersuchungen Löslichkeitsunterschiede zwischen racemischer Verbindung und Enantiomer beobachtet, welche jedoch nicht Gegenstand weiterer Untersuchungen waren. In Hinsicht auf einen möglichen therapeutischen Einsatz der Substanzklasse wird deutlich, dass enantiomere oder racemische Verunreinigungen einen Einfluss nicht nur auf die pharmakodynamischen,

sondern auch auf pharmakokinetische Prozesse haben können. Die Prüfung auf enantiomere Verunreinigungen im Rahmen der Reinheitsprüfung offizineller Arzneistoffe sollte daher nicht nur Arzneistoffe, bei denen ein Enantiomer eingesetzt wird, einschließen, sondern auch auf racemische Verbindungen ausgeweitet werden. In der Literatur werden solche Phänomene auch für andere Verbindungen beschrieben. Beispielsweise bewirkt eine geringe enantiomere Verunreinigung des racemischen Ephedrin 2-naphthalensulfonats eine 27 %ige Steigerung der intrinsischen Lösungsrate (intrinsic dissolution rate) [43].

Physikalische Trennmethode. Die Voraussetzung eines Konglomerates für eine physikalische Trennung (manuelle Trennung, Vorzugskristallisation) ist bei (*R,S*)-N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat gegeben. Eine Kristallisation des Racemates unter Gleichgewichtsbedingungen, d. h. beide Enantiomere kristallisieren in enantiomorphen Kristallen nebeneinander aus, führte zu keiner durchführbaren manuellen Trennung. Erst durch Animpfen der racemischen Lösung mit einem homochiralen Kristall des *S*-Enantiomers, konnte durch kontinuierliches Kristallwachstum das *S*-Enantiomer bevorzugt aus der Lösung entfernt werden. Unter den gewählten Bedingungen wurde die spontane Kristallisation des *R*-Enantiomers verhindert, welches sich dann in der Mutterlauge anreicherte. Durch HPLC-Kontrolle kann indirekt das Abscheiden des *S*-Enantiomers und direkt die Anreicherung des *R*-Enantiomers in der Mutterlauge verfolgt werden. Die Vorzugskristallisation lässt sich auch im großen Maßstab durchführen, indem aus der gesättigten racemischen Lösung zunächst das *S*-Enantiomer auskristallisiert wird. Anschließend wird aus der Mutterlauge (mit *R*-Enantiomer angereichert) mittels Impfkristall das *R*-Enantiomer auskristallisiert. In mehreren Zyklen lassen sich größere Mengen der getrennten Enantiomere gewinnen. Industriell wird diese Methode beispielsweise für eine Synthesestufe des Antibiotikums Chloramphenicol genutzt. Um weitere N-Methyl-4-piperidyl benzilate mittels Vorzugskristallisation trennen zu können, müssten zusätzliche Untersuchungen durchgeführt werden. Bekannt ist, dass racemische Verbindungen durch Derivatbildung (Salzbildung) in Konglomerate übergeführt werden können [44]. Obwohl beispielsweise (\pm)-Weinsäure racemisch kristallisiert, konnte das racemische Natriumammoniumtartrat unterhalb von 28°C als Konglomerat durch PASTEUR erhalten werden. Eine Veränderung der intermolekularen Bindungskräfte durch Derivatisierung wurde für N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethylbenzilat (**77**) nachgewiesen (Tab. 6). Die Base **77** ist durch eine größere Affinität zwischen gleichen Enantiomere charakterisiert ($Fp_{\text{Enantiomer}} > Fp_{\text{Racemat}}$). Dagegen wird durch

Hydrochloridbildung der Verbindung **77** die Affinität zwischen entgegengesetzten Enantiomeren erhöht ($Fp_{\text{Racemat}} > Fp_{\text{Enantiomer}}$). Die Derivatisierung von **77** führte somit zwar zu veränderten intermolekularen Bindungsverhältnissen, aber nicht zu einer gewünschten Konglomeratformation.

Weiterhin müssen Temperatureinflüsse auf die Racemform genauer untersucht werden. In der Literatur werden einige Fälle beschrieben, bei denen oberhalb oder unterhalb einer bestimmten Temperatur Konglomerate anstelle ihrer racemischen Verbindung erhalten werden [42].

Chemische Trennung. Die meisten Racematspaltungen verlaufen indirekt über eine Diastereomerentrennung. Die Diastereomerenbildung über kovalente Bindung der untersuchten chiralen Auxiliare durch Variation des Esterrestes führte zu nicht kristallisierenden Derivaten, die damit keiner fraktionierten Kristallisation unterworfen werden konnten. Untersucht wurden hierbei (-)-Menthyl- und (-)-8-Phenylmenthylester der substituierten Benzilsäure. Der Versuch der Diastereomerenbildung durch Umsetzungen des tertiären Alkohols wurde aufgrund von Reaktivitätsproblemen tertiärer Alkohole verworfen. Die Racemattrennung gelang schließlich durch Bildung diastereomerer Salze des Piperidyl benzilates mit Weinsäurederivaten. Von sieben untersuchten Racematen (**72**, **75** bis **80**) wurden bei sechs Vertretern Salzbildung beobachtet. Die Anreicherung eines Enantiomers durch fraktionierte Kristallisation gelang bei den Verbindungen **77**, **78** und **79**. Weinsäure selbst stellte sich als nicht geeignetes Spaltreagenz heraus. Entweder bildeten sich keine Salze oder es wurde keine Diskriminierung eines Diastereomers beobachtet. Die Schwierigkeiten der Salzbildung mit Weinsäure lassen sich eventuell auf die zu geringe Acidität der Weinsäure bzw. zu geringe Basizität des Racemates zurückführen. Dagegen konnten erste Erfolge mit Acylderivaten wie Dibenzoyl- und Di-p-toluoylweinsäure verzeichnet werden. Durch die höhere Acidität der Acylderivate ist vermutlich die verbesserte Salzbildung zu erklären. Zudem könnten die Aroylfunktionen für eine verbesserte Diastereomerendiskriminierung mitverantwortlich sein [36].

Wesentlich effizienter (geringere Anzahl von Umkristallisationen) wird die Racematspaltung durch Verwendung einer Mischung aus Weinsäurederivaten (Dibenzoyl- und Di-p-toluoylweinsäure) als Spaltreagenz. VRIES et al. vermuteten zunächst, dass die am schwersten löslichen diastereomeren Salze ausfallen würden. In den Experimenten konnten immer mehrere Komponenten des Spaltreagenzes in den Salzen nachgewiesen

werden [39]. NMR-spektroskopische Untersuchungen zur Zusammensetzung des Weinsäuresalzes von Verbindung **79** bestätigen die Beobachtung von VRIES.

Ist eine geeignete Methode für die fraktionierte Kristallisation von N-Methyl-4-piperidyl benzilaten gefunden, ist die Darstellung von großen Mengen (Gramm-Bereich) auf wirtschaftlichem Wege möglich. Zugleich kann hohe enantiomere Reinheit mit geringem finanziellem Aufwand erreicht werden. Trotz intensiver Bemühungen mit computergestützten Modellen [45] und Untersuchungen der Kristallstrukturdaten diastereomerer Salze [46] gelang es bisher nicht, eine Theorie zu entwickeln, die als allgemeine Grundlage für die Racematspaltungen dienen könnte. Somit lassen sich die Kristallisationsmethoden auch nicht auf alle Derivate der N-Methyl-4-piperidyl benzilate übertragen. Durch systematische Variation der Trennreagenzien und des Lösungsmittels muss empirisch für jede Verbindung individuell nach einer zweckmäßigen Methode gesucht werden.

3.1.4 Chromatographische Methoden

Chiralität spielt in biologischen Prozessen eine entscheidende Rolle. Mit der Entwicklung der chromatographischen Möglichkeiten (analytische und präparative Racemattrennung) in den letzten beiden Jahrzehnten konnten neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet gewonnen werden [47]. Im Folgenden soll die Anwendbarkeit chromatographischer Trennverfahren auf racemische Benzilsäurederivate überprüft werden.

Die untersuchten chromatographischen Methoden lassen sich gliedern in:

- ☐ direkte Racemattrennung (chirale stationäre Phase),
- ☐ indirekte Racemattrennung (achirale stationäre Phase).

Für die direkte Racematspaltung werden heute am häufigsten chirale Adsorbentien wie Polysaccharide (Celluloseester und Phenylcarbamate von Cellulose und Amylose) verwendet [48]. Chemisch modifizierte Umkehrphasen (Reverse Phase, RP) lassen sich für die indirekte Trennung einsetzen.

3.1.4.1 Direkte Racemattrennung an chiralen stationären Phasen

Es wurde eine Auswahl geeigneter chiraler stationärer Phasen für die Trennung von Benzilsäurederivaten getroffen [49]. An Säulenmaterialien auf Cellulose- und Amylosegrundlage wurden strukturell verwandte Verbindungen wie Atropin, Homatropin und Mandelsäurederivate erfolgreich getrennt (Tab. 9).

Tab. 9: Analytische Trennung strukturverwandter Verbindungen

Verbindung	Strukturmerkmale	Beispiele	Säulenmaterial*
Basische Benzilsäureester	aromatisch	Atropin	Chiralcel OD [50]
	Carbonylfunktion	Homatropin	Chiralcel OD [50]
	alkoholische Gruppe	Oxyphencyclimin	ChiralpakAD [51]
	stickstoffhaltig		
Benzilsäuren	aromatisch	Mandelsäure	Chiralcel OD [52]
Methyl benzilat	Carbonylfunktion	Methyl mandelat	Chiralcel OJ [51]
	alkoholische Gruppe		

* Chiralpak AD: Amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate), 250-4,6 (10 µm)

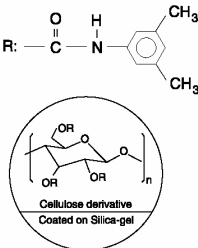
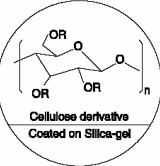
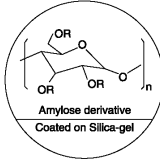
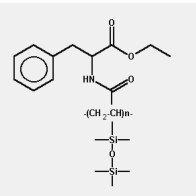
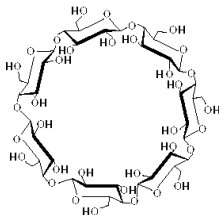
Chiralcel OD: Cellulose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate), 250-4,6 (10 µm)

Chiralcel OJ: Cellulose tris (4-methylbenzoate), 250-4,6 (10 µm)

Ergänzt wurde die Auswahl durch Chiraspher und β -Cyclodextrin. Chiraspher ist eine stationäre Phase auf Basis von Kieselgelpartikeln, die mit dem optisch aktiven Polymer Poly-(N-Acryloyl-S-phenylalaninethylester) beschichtet sind. Die stereoselektiven Wechselwirkungen mit den Enantiomeren vollziehen sich innerhalb chiraler Hohlräume der Polymerschicht über Wasserstoffbrücken und π - π -Wechselwirkungen. BLASCHKE et al. waren maßgeblich an der Entwicklung dieser polymeren chiralen stationären Phasen beteiligt [53]. An β -Cyclodextrin (Chiradex) wurden bereits erfolgreiche Trennungen von strukturell verwandten Verbindungen (Diphenylmethanderivaten [54, 55], Cyclohexylphenylglyoxylsäure [56, 57] beschrieben. Die Trennung basiert unter anderem auf Einlagerung eines Moleküls oder Molekülteils in den chiralen Sektor. Die entstehenden diastereomeren Komplexe dissoziieren verschieden schnell und tragen damit zu unterschiedlichen Retentionszeiten bei.

Vorversuche. Die Trennungen der racemischen 3-methoxysubstituierten Derivate der Benzilsäure (**52**), des Methylesters (**69**) und des Piperidylesters (**79**) wurden an den chiralen stationären Phasen untersucht (Tab. 10).

Tab. 10: Direkte Racemattrennung von 3-Methoxybenzilsäure (**52**), Methyl 3-methoxybenzilat (**69**), N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (**79**)

Stationäre Phase*	Verbindung	Bemerkung**	Methode
Chiralcel OD 	52	+	n-Hexan (75 bis 95)/2-Propanol (25 bis 5), Zusatz von Diethylamin 0,01-0,1 für Basen bzw. Essigsäure 0,01 bis 0,05 für Säuren
	69	+	
	79	-	
Chiralcel OJ 	52	-	n-Hexan (90 bis 95)/2-Propanol (10 bis 5)
	69	-	
	79	-	n-Hexan (95)/Ethanol (5)
	52	+	
Chiralpak AD 	52	-	n-Hexan (50 bis 95)/2-Propanol (50 bis 5), Zusatz von Diethylamin 0,01-0,1 für Basen bzw. Essigsäure 0,01 bis 0,05 für Säuren
	69	-	
	79	++	
	69	+	Methanol (100)
Chiraspher 	52	-	n-Hexan (80 bis 93)/2-Propanol (20 bis 7), Zusatz von Diethylamin 0,01-0,1 für Basen bzw. Essigsäure 0,01 für Säuren
	69	-	
	79	-	
ChiraDex 	52	-	Gemische aus Ethanol, Methanol und Acetonitril mit wässrigen Pufferlösungen (pH 3,0 bis 7,5)
	69	-	
	79	-	

* Chiralpak AD: Amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate), 250-4,6 (10 µm)

Chiralcel OD: Cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate), 250-4,6 (10 µm)

Chiralcel OJ: Cellulose tris(4-methylbenzoate), 250-4,6 (10 µm)

Chiraspher: Poly-(N-Acryloyl-S-phenylalaninethylester), 250-4 (5µm)

ChiraDex: β-Cyclodextrin, 250-4 (5µm)

** - keine Trennung, + Trennung ohne Basislinientrennung, ++ sehr gute Trennung mit Basislinientrennung

Viel versprechend verliefen die Trennungen des N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzylates (**79**) und des Methyl 3-methoxybenzylates (**69**) an Amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) (Chiralpak AD) als stationäre Phase. An den Cellulosederivaten Chiracel OJ und OD wurden ebenfalls Racemattrennungen, jedoch mit geringer chromatographischer Auflösung, verzeichnet. Dagegen erwiesen sich Chiraspher und Chiradex (β -Cyclodextrin) in jeder Beziehung als ungeeignet, um Derivate racemischer Benzilsäuren zu trennen.

Analytische HPLC-Trennungen an Chiralpak AD. Weitere Benzilatderivate wurden zur analytischen Charakterisierung der oben genannten Methode an Chiralpak AD (Tab. 10) unterzogen. Gute Trennungen zeigten Verbindungen der Piperidylester (Tab. 11). Dagegen erwies sich die Methode für verschieden substituierte Methylester als nicht zweckmäßig. Die Zuordnung der absoluten Konfiguration zu den jeweiligen Peaks im HPLC-Chromatogramm konnte über die *S*-Enantiomere, welche durch stereoselektive Synthese gewonnen wurden, realisiert werden. Die Güte der Trennung wird durch die chromatographische Auflösung R_s beschrieben.

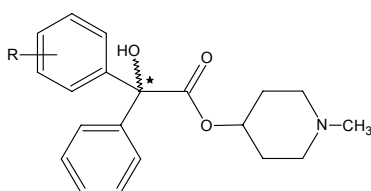
Die Auflösung wurde aus der Differenz der Gesamtretentionszeiten (t_{ges}) (Totzeit + Nettoretentionszeit (Zeit der Substanz in oder an der stationären Phase)) von Peak 1 und 2, sowie der Summe der Halbwertsbreite (*HWB*) von Peak 1 und 2 berechnet [58]. Da sich bei ungenügender

$$R_s = 1,18 \cdot \frac{t_{\text{ges}}(2) - t_{\text{ges}}(1)}{HWB(2) + HWB(1)}$$

Trennleistung die Basisbreite der Peaks nur unzureichend bestimmen ließ, wurde die Halbwertsbreite der Peaks verwendet, die durch den Faktor 1,18 berücksichtigt wird.

Optimierung der Trennleistung. Die Möglichkeiten der Optimierung einer Methode sind begrenzt. Ist die chromatographische Auflösung $R_s < 1,4$, liegen zwei Peaks unvollständig getrennt im Chromatogramm vor. Eine Modifikation des Eluenten bzw. die Zusammensetzung des Eluentengemisches kann die Trennleistung verbessern. Allerdings werden für Chiralpak AD nur Gemische aus n-Hexan/2-Propanol und n-Hexan/Ethanol beschrieben. Neben n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin (in verschiedenen Anteilen) wurde reines Methanol als Eluent verwendet. Die Mischung n-Hexan/Ethanol/Diethylamin erbrachte keine Vorteile. Methanol eignet sich nur für eine schnelle chromatographische

Tab. 11: Retentionszeiten und chromatographische Auflösung R_S von enantiomeren N-Methyl-4-piperidyl benzilaten



Substitution R (Verbindungs-Nr.)	Retentionszeit t (min)	Methode*: Eluent**, Fluss, UV	Auflösung R _S
4- <i>tert</i> -Butyl-	(1)	<i>R</i> 23,74	1,21
	(2)	<i>S</i> 25,81	
4-Methylsulfonyl-	(17)	<i>R</i> 18,10	1,12
	(18)	<i>S</i> 19,52	
4-Trifluormethoxy-	(9)	<i>R</i> 13,03	2,85
	(10)	<i>S</i> 10,48	
4-Trifluormethyl-	(11)	<i>R</i> 15,28	8,92
	(12)	<i>S</i> 11,41	
3-Methoxy-	(15)	<i>R</i> 11,28	2,13
	(16)	<i>S</i> 13,13	
3,5-Dimethoxy-	(13)	<i>R</i> 9,62	2,73
	(14)	<i>S</i> 11,87	
4- <i>n</i> -Butyl-	(3)	<i>R</i> 17,57	1,01
	(4)	<i>S</i> 16,75	
4-Butoxy-	(5)	<i>R</i> 30,87	1,09
	(6)	<i>S</i> 29,49	
4-Dimethylamino-	(7)	<i>R</i> 14,90	1,40
	(8)	<i>S</i> 15,87	
4-Methoxy-	(94)	keine Trennung	
3,4-Dihydroxy-	(93)		
3,4-Dimethoxy-	(92)		
3-Trifluormethoxy-	(81)		

* Chiralpak AD, 250 nm x 4,6 mm

** Eluent: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin

Trennung mit kurzen Retentionszeiten an Chiralpak AD. Nachteile sind die geringe chromatographische Auflösung und ein peak-Tailing. Die Mehrzahl der erfolgreichen Trennungen wurde mit n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin als mobiler Phase vollzogen. Eine Erhöhung der Trennstufenzahl und damit verbundene Optimierung der Trennleistung kann erreicht werden, indem die Wechselwirkung zwischen Benzilat und stationärer Phase erhöht wird. Dieses wurde durch eine Modifizierung der Polarität des Eluentengemisches (verschiedene Verhältnisse von n-Hexan/2-Propanol) realisiert. Häufig verlängerten sich dadurch jedoch die Retentionszeiten. Zu lange Retentionszeiten (> 20 min) machen sich durch eine inakzeptable Peakverbreiterung bemerkbar. Die VAN-DEEMTER-Kurve beschreibt diesen Effekt in Abhängigkeit von der Strömungsgeschwindigkeit. Eine Gegenregulation durch Erhöhung der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase ist bis zum Erreichen eines Drucklimits möglich. Weitere Einschränkungen bestehen bezüglich der Verhältnisse von n-Hexan/2-Propanol. Die höhere Viskosität von 2-Propanol macht sich in einem Anstieg des Druckes bemerkbar und limitiert eine gegebenenfalls nötige Optimierung der Trennleistung. Für analytische Zwecke kann eine Gradientenmethode für die Trennleistung große Vorteile bringen. Da die analytische Methode nachfolgend auf semipräparativen Maßstab übertragen werden soll, wird eine isokratische Methode gegenüber einer Gradientenmethode bevorzugt.

Enantiomerendiskriminierung und Elutionsreihenfolge. Eine stereoselektive Diskriminierung sowie die Elutionsreihenfolge der *R*- und *S*-Enantiomere werden von der Substitution der Phenylringe bestimmt. Bei einer Änderung der Stellung der Methoxygruppe von Position 3 (**79**) nach 4 (**94**) des Piperidyl benzilates lässt sich unter den beschriebenen HPLC-Bedingungen keine Enantiomerentrennung mehr erzielen (Tab. 12). Befindet sich dagegen in Position 4 eine Trifluormethoxygruppe (**76**), werden die Peaks hinsichtlich ihrer absoluten Konfiguration von **79** vertauscht. Das *S*-Enantiomer eluiert vor dem *R*-Enantiomer. Ein gleichartiger Effekt wird für Verbindungen mit identischer Kernsubstitution, jedoch mit unterschiedlichen Alkoholresten in der Esterkomponente, beobachtet. Im Vergleich zum Piperidylester **79** (*R* vor *S*) eluiert beim Methylester der 3-Methoxyverbindung (**69**) das *S*-Enantiomer vor dem *R*-Enantiomer (Tab. 12). Ein Zusammenhang zwischen der Art der Substitution des Benzilatmoleküls und deren Einfluss auf die Reihenfolge der eluierenden Enantiomere (*S* vor *R* oder *R* vor *S*) konnte nicht festgestellt werden.

Tab. 12: Elutionsreihenfolge strukturell verwandter Benzilate

Verbindung	Elutionsreihenfolge
Methyl 3-methoxybenzilat (69)	<i>S</i> vor <i>R</i>
N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (79)	<i>R</i> vor <i>S</i>
N-Methyl-4-piperidyl 4-methoxybenzilat (94)	keine Trennung
N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethoxybenzilat (76)	<i>S</i> vor <i>R</i>

Semipräparative Methode. Für ein erstes pharmakologisches Screening der Enantiomere wurden von (*R*)- bzw. (*S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-dimethylaminobenzilat (**7/8**) und (*R*)- bzw. (*S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethoxybenzilat (**9/10**) kleine Mengen im Bereich von 8 bis 10 mg pro Enantiomer gewonnen. 0,5 mg Racemat können pro Zyklus (Injektion) an Chiralpak AD getrennt werden, d. h. nach 40 Zyklen werden ca. 8 bis 10 mg pro Enantiomer gewonnen. Dabei muss die Detektorempfindlichkeit so weit verringert werden, dass der höchste Punkt des Peaks noch erkannt und der Verlauf des Peaks vollständig verfolgt werden kann. Der Beginn des Fraktionensammelns kann andernfalls nicht eindeutig festgelegt werden.

3.1.4.2 Indirekte Racemattrennung an achiraler stationärer Phase

Bei der indirekten Racemattrennung verläuft die Trennung des Racemates über Diastereomere, die aufgrund ihrer unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften in einer achiralen Umgebung vollzogen werden kann. Dazu müssen geeignete Diastereomere aus den Enantiomeren

gebildet werden. Beispielsweise verwendet MEYERS chirale Oxazoline, um α -substituierte Mandelsäure chromatographisch zu trennen (Abb. 13) [59]. Eine Alternative zu den chiralen Oxazolinen und (-)-8-Phenylmenthyl-derivaten stellen einfache (-)-Menthylester

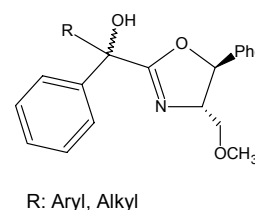
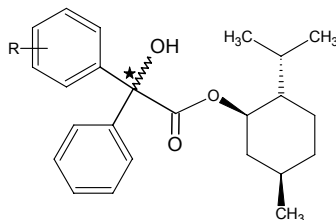


Abb. 13: Chirale Oxazoline

der racemischen Benzilsäure dar. Die Synthese der (-)-Menthyl benzilate gelingt durch Umesterung der adäquaten racemischen Methylester, welche eine Synthesestufe zu den enantiomeren und racemischen Zielstrukturen darstellen. Aufgrund der schlechten Kristallisationsneigung der (-)-Menthyl benzilate ist eine Trennung durch fraktionierte

Kristallisation nicht möglich. Daher sollten die Möglichkeiten einer chromatographischen Trennung an einer achiralen stationären Phase untersucht werden. An modifiziertem Kieselgel (RP-18) gelingt bis auf (-)-Menthyl 4-trifluormethoxybenzilat (**83**) die Trennung aller Verbindungen unter den in Tab. 13 angegebenen Bedingungen.

Tab. 13: Diastereomerentrennung durch RP-HPLC



Substitution R (Verbindungs-Nr.)	Retentionszeit t (min)	Methode	Auflösung R _S
4-Dimethylamino- (82)	t ₁ : 27,33 t ₂ : 29,22		1,35
4-Trifluormethoxy- (83)	t ₁ : 37,58 t ₂ : -	LiChrospher RP-18 250-4 (5 µm), Acetonitril/Wasser 70/30 Fluss: 1,5 ml/min	-
3-Methoxy- (84)	t ₁ : 18,94 t ₂ : 19,81	Detektion: λ = 230 nm und 281 nm	0,92
3,4-Dimethoxy- (85)	t ₁ : 12,09 t ₂ : 13,45		1,73 (Abb. 14)
4-Methylsulfonyl- (86)	t ₁ : 7,66 t ₂ : 8,25		1,58

Am Beispiel der 3,4-Dimethoxyverbindung (**85**) konnte die analytische Methode (Abb. 14) erfolgreich auf eine semi-präparative Säule übertragen werden (LiChrospher RP-18, 250-10, 7 µm). Für die semipräparative Arbeit erwies sich ein Gemisch von Acetonitril/Wasser 50:50 bei einem Fluss von 3 ml/min als Optimum.

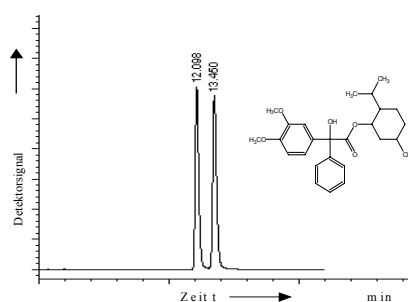


Abb. 14: HPLC-Chromatogramm von (-)-Menthyl (*R,S*)-3,4-dimethoxybenzilat (**85**)

20 mg (-)-Menthyl 3,4-dimethoxybenzilat wurden dabei pro Zyklus injiziert und getrennt. Nach 10 Zyklen konnten 90 bis 100 mg pro Diastereomer erhalten werden.

3.1.4.3 Diskussion

Untersuchungen zur chromatographischen Trennung zeigen, dass sich racemische Benzilsäurederivate durch direkte und indirekte Methoden trennen lassen. Generell sind chromatographische Trennungen durch hohe ee- und de-Werte der gewonnenen Enantiomere/Diastereomere gekennzeichnet, da auftretende Mischfraktionen verworfen werden können.

Direkte Racemattrennung an chiraler Phase. Aus dem Pool von β -Cyclodextrin (Chiradex), Poly-(N-Acryloyl-S-phenylalaninethylester (Chiraspher), Celluloseestern (Chiralcel OJ), -carbamaten (Chiralcel OD) und Amylosecarbamaten (Chiralpak AD) stellte sich Amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) als geeignete stationäre Phase heraus. Ein Vergleich mit Cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate), welches durch eine identische Substitution der Phenylringe gekennzeichnet ist, belegt, dass das Biopolymer Amylose für die verbesserte Selektivität verantwortlich ist. Das ist insofern bemerkenswert, als Cellulose wie auch Amylose unverzweigte, aus D-Glucose aufgebaute Ketten sind. Der einzige Unterschied besteht in der 1,4-glykosidischen Bindung: Amylose ist α -glykosidisch, Cellulose ist β -glykosidisch verknüpft. Die in Vorversuchen entwickelte und optimierte Methode für N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (**79**) konnte in den meisten Fällen auf andere N-Methyl-4-piperidyl benzilate übertragen werden. Eine Basislinientrennung wurde für die Verbindung **75**, **76**, **78**, **79** und **80** erreicht ($R_S \geq 1,4$), was Voraussetzung für eine genaue quantitative Bestimmung der Enantiomerenzusammensetzung ist. Verbindungen mit schlechter Auflösung wie N-Methyl-4-piperidyl 4-n-butylbenzilat (**73**) ($R_S = 1,01$) und N-Methyl-4-piperidyl 4-butoxybenzilat (**74**) ($R_S = 1,09$) lassen zwar eine Zuordnung der Enantiomere zu, jedoch sind exakte quantitative Bestimmungen nicht möglich. Eine Aussage darüber, nach welchen Gesetzmäßigkeiten eine stereoselektive Diskriminierung enantiomerer Benzilate an Amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) verläuft, kann nicht getroffen werden. Beispielsweise kann N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethoxybenzilat (**77**) mit einer großen Auflösung ($R_S = 8,92$) getrennt werden, hingegen zeigt das Stellungsisomer 3-Trifluormethoxybenzilat (**81**) nicht einmal ansatzweise eine Racemattrennung. Auffällig

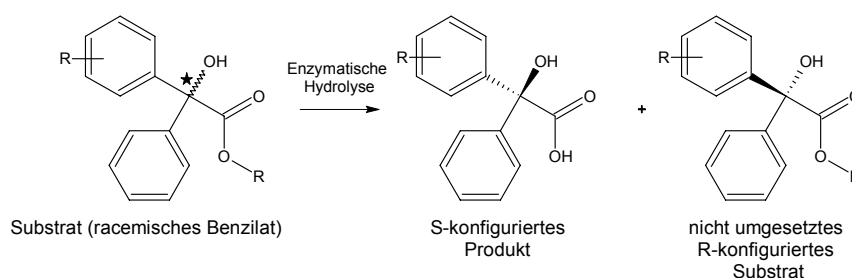
ist eine Änderung der Elutionsreihenfolge von *R*- und *S*-konfigurierten Benzilaten in Abhängigkeit geringer struktureller Veränderungen, z. B. Abwandlung der Substitution am Aromaten oder des Esterrestes. So eluiert das *R*-Enantiomer der 4-*tert*-Butylverbindung (**1**) gegenüber dem *S*-Enantiomer zuerst. Handelt es sich dagegen um eine *n*-Butylgruppe in 4-Position, wird das *S*-Enantiomer (**4**) zuerst eluiert. Das Herleiten der absoluten Konfiguration einer Substanz von einer strukturell verwandten Verbindung mit bekannter Konfiguration, basierend auf der Elutionsreihenfolge, ist somit ausgeschlossen. Die Zuordnung der absoluten Konfiguration zu den einzelnen Peaks muss in jedem Fall sorgfältig durch synthetisierte, enantiomere Vergleichssubstanz erfolgen.

Die Racemattrennungen der Synthesestufen der Zielstrukturen (Benzilsäuren, Methyl benzilate) gelingen nur vereinzelt. An Chiracel OD und OJ konnten ansatzweise racemische 3-Methoxybenzilsäuren (**89**) getrennt werden. Für Methyl 3-methoxybenzilat (**69**) wurde eine Methode an Chiracel AD entwickelt. Jedoch lassen sich diese Methoden nicht mit gleichem Erfolg (geringere chromatographische Auflösung R_s) auf andere Derivate (Benzilsäuren und Methyl benzilate) übertragen, wie es bei den *N*-Methyl-4-piperidyl benzilaten möglich war.

Indirekte Racemattrennung an achiraler stationärer Phase. Wenn die direkte Racemattrennung versagt (z. B. *N*-Methyl-4-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat (**92**)), lässt sich eine indirekte Trennung über Diastereomerengemische durchführen. Durch Bildung von (-)-Menthyl benzilaten wurden geeignete Diastereomerengemische erhalten. Die Trennung der diastereomeren Menthylester **82**, **84**, **85** und **86** gelingt durch RP-Chromatographie mit Ausnahme des Menthylesters der 3-Trifluormethoxyverbindung (**83**). Für Verbindung **85** wurde diese Methode mit einer chromatographischen Auflösung von $R_s=1,76$ erfolgreich auf den semipräparativen Maßstab übertragen. Mengen von 100 mg bis 200 mg lassen sich durch semipräparative HPLC gewinnen. Ein weiteres Up-Scaling auf eine präparative Methode zur Gewinnung größerer Mengen (500 mg bis 1 g) sollte möglich sein. Ein Nachteil der indirekten Methode ist ein zusätzlicher Syntheseaufwand zur Herstellung der Diastereomere sowie eine anschließende Regeneration der Enantiomere.

3.1.5 Enzymatische Umsetzung

Enzyme sind chirale Makromoleküle. Als solche können sie Reaktionen hochselektiv (enantio- und regioselektiv) katalysieren. Enzymreaktionen verlaufen meist unter relativ milden Bedingungen, d. h. bei Raumtemperatur und bei pH-Werten um den Neutralpunkt. Das ist eine wichtige Voraussetzung für Verbindungen, die zu Instabilitäten und Racemisierung neigen. In Untersuchungen zur Metabolisierung von N-Methyl-4-piperidyl benzilaten an der Ratte wurden unter anderem Benzilsäuren als Metabolite gefunden [60, 61, 62]. Durch enzymatischen Abbau sind diese aus ihren Estern hervorgegangen. Somit stellen Benzilsäureester potenzielle Substrate für Enzyme dar. Die enantiomere Reinheit des Produktes ist im Wesentlichen von der Enantioselektivität des Enzyms abhängig. Im Folgenden soll untersucht werden, ob sich enantiomere Benzilate durch enzymkatalytische Umsetzung darstellen bzw. anreichern lassen (Schema 13).



Schema 13: Enzymatische Hydrolyse von Benzilsäureestern

Da Enzyme unter Umständen eine geringe Substratbreite besitzen, wurde nach geeigneten Enzymen gesucht, die Substrate mit strukturellen Ähnlichkeiten zu den Benzilsäuren katalytisch umsetzen:

- ☐ *Candida rugosa* Lipase = *Candida cylindracea* Lipase (CCL): Veresterung von α -Hydroxysäuren mit n-Butanol [63], Hydrolyse chiraler Carbonsäureester [64]
- ☐ *Pseudomonas cepacia* Lipase (PCL): Hydrolyse von Carbonsäureestern [65], Hydrolyse von α -Hydroxycarbonsäureestern [66]
- ☐ Schweineleberesterase (pig liver esterase, PLE): Hydrolyse von α -Acetoxy- α -arylacetaten [67]

- Schweinepankreaslipase (porcine pancreatic lipase, PPL): Hydrolyse von chiralen Carbonsäureestern [68]

3.1.5.1 Vorversuche - Enzymscreening

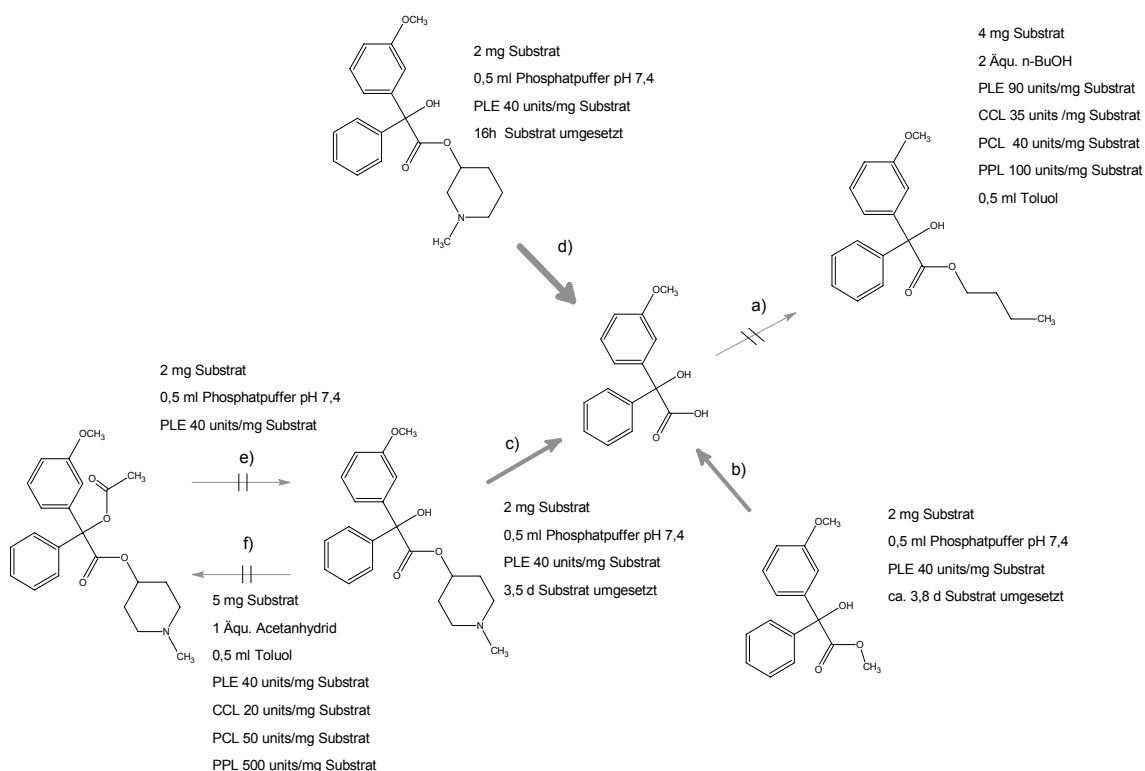
In Vorversuchen sollte festgestellt werden, ob Umsetzungen verschiedener Benzilsäurederivate durch CCL, PCL, PLE und PPL katalysiert werden. Folgende enzymkatalysierte Reaktionen wurden getestet:

- a) Veresterung der Benzilsäure mit n-Butanol
- b) Esterhydrolyse von Methyl benzilaten
- c) Esterhydrolyse von 4-Piperidyl benzilaten
- d) Esterhydrolyse von 3-Piperidyl benzilaten
- e) Esterhydrolyse der acetylierten tertiären alkoholischen Gruppe
- f) Veresterung der tertiären alkoholischen Gruppe mit Acetanhydrid

Die Esterhydrolysen (b, c, d, e) wurden in Phosphatpuffer pH 7,4 durchgeführt. Die untersuchten Cosolventien Aceton und Acetonitril (bis 20 %) erbrachten keinen Vorteil. Für die Veresterungen (a, f) wurde Toluol als organisches Lösungsmittel eingesetzt. Sämtliche Enzymreaktionen wurden bei einer Temperatur von 37°C ausgeführt. Eine Blindprobe (Substrat ohne Enzymzusatz) wurde zu jeder Zeit mitgeführt. Die enzymatischen Umsetzungen wurden dünnschichtchromatographisch s. Kap. 4.: FM I oder FM II, Detektion: Schwefelsäure verfolgt. Eine Übersicht der enzymatischen Umsetzungen ist in Schema 14 dargestellt. Die Stärke der Pfeile entspricht der quantitativen Umsetzung der Substrate. Neben den 3-Methoxyderivaten (Schema 14) wurden weitere Verbindungen als Substrate eingesetzt. Allein durch dünnschichtchromatographische Auswertung der Substratumsetzung konnte eine Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit vom Substitutionsmuster beobachtet werden (Tab. 14). Die Blindproben zeigten zu keiner Zeit dünnschichtchromatographisch sichtbare Hydrolyseprodukte.

Tab. 14: Enzymatische Umsetzung von racemischen Benzilsäurederivaten

a)	b)	c)	d)	e)	f)
Substitution R					
Keine enzymatische Umsetzung:					
3-CH ₃ O-, 5-CH ₃ O-		4- <i>tert</i> -C ₄ H ₉ -		3-CH ₃ O-	3-CH ₃ O-
3-CH ₃ O-		4-CH ₃ SO ₂ -			
Enzymatische Umsetzung:					
4-CH ₃ SO ₂ -	3-CH ₃ O-, 5-CH ₃ O-	3-CH ₃ O-			
3-CH ₃ O-	4-(CH ₃) ₂ N-	3-CH ₃ O-,5-CH ₃ O-			
3-CH ₃ O-,5-CH ₃ O-	4-C ₄ H ₉ O-				
4-F ₃ C-	4- <i>n</i> -C ₄ H ₉ -				
	4-F ₃ C-				
	4-F ₃ CO-				
	3-CH ₃ O-				
<p>→ Zunahme der Hydrolysegeschwindigkeit</p>					



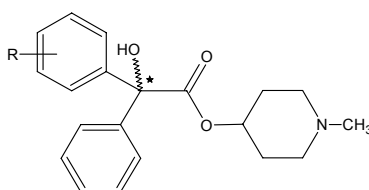
Schema 14: Enzymatische Umsetzung von Benzilsäurederivaten

Auf fortführende quantitative Untersuchungen zu den Hydrolysegeschwindigkeiten wurde an dieser Stelle verzichtet. Vielmehr sollte eine eventuell vorhandene Enantioselektivität, die für eine kinetische Racematspaltung zwingend erforderlich ist, geklärt werden.

3.1.5.2 Enantioselektivität der enzymatischen Reaktion

Basierend auf den in den Vorversuchen erzielten Erkenntnissen wurde speziell die Hydrolyse von substituierten N-Methyl-4-piperidyl benzilaten (c) und Methyl benzilaten (b) durch PLE genauer untersucht. Es wurden kontinuierlich Proben (100 µl) zu folgenden Zeiten entnommen: 1 h (Raumtemperatur, geschüttelt), 16 h (37°C), 20 h (37°C), 33 h (37°C), 65 h (37°C), 85 h (37°C), 100 h (37°C), 120 h (37°C). Die enantioselektive Hydrolyse wurde mittels HPLC durch Bestimmung der enantiomeren Zusammensetzung des Substrates verfolgt (Tab. 15). PLE zeigte an den Methyl benzilaten keine Enantioselektivität. Die Methyl benzilate sind daher nicht in der Tab. 15 aufgeführt.

Tab. 15: Resultate der enzymatischen Hydrolyse



Substitution R (Verbindungs-Nr.)	Enantiomerenverhältnis [%]*	Inkubationszeit bei 37°C(h)
3-CH ₃ O- (79)	61,2:38,8 (<i>S</i>)	65
3-CH ₃ O-, 5-CH ₃ O- (78)	62,0:38,0 (<i>S</i>)	100
4-F ₃ C- (77)	43,7:55,7 (<i>S</i>)	16
4-CH ₃ SO ₂ - (80)	45,0:55,0 (<i>R</i>)	74,5
4-CF ₃ O- (76)	40,5:59,5 (<i>S</i>)	16

*in Klammern befindet sich das Enantiomer, welches bevorzugt durch PLE hydrolysiert wird

Innerhalb der 4-Piperidylestergruppe (c) konnte eine nur mäßige Enantioselektivität der PLE festgestellt werden. Das *S*-Enantiomer wurde als Substrat bevorzugt von PLE umgesetzt (Ausnahme: 4-Methylsulfonylverbindung (80)). Ist die enantiomere Reinheit

des Substrates oder des Produktes sowie die prozentuale Umsetzung bekannt, kann der E-Wert (biochemischer Stereoselektivitätsfaktor) bestimmt werden. Der E-Wert ist ein Maß für die Enantioselektivität eines Enzyms. Für N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (79) wurde mit Gleichung:

$$E = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_{\text{Substrat}})]}{\ln[(1-c)(1+ee_{\text{Substrat}})]}$$

E: E-Wert (biochemischer Stereoselektivitätsfaktor)
 ee_{Substrat} : Enantiomerenüberschuss des Substrates
 c: Umsetzung

ein E-Wert von nur 1,4 berechnet. Für synthetische Zwecke sind enzymatische Umsetzungen erst ab einem $E > 20$ sinnvoll [69]. Daher wurden die Experimente an dieser Stelle abgebrochen.

3.1.5.3 Diskussion

Enzymatische Umsetzungen mit den favorisierten und untersuchten Enzymen (PLE, PCL, CCL, PPL) eignen sich nicht zur Darstellung von enantiomerenreinen Benzilaten. Lediglich eine Anreicherung eines Enantiomers kann realisiert werden.

Die Untersuchungen zeigen, dass Benzilate Substrate für enzymatische Hydrolysen darstellen (b, c und d, Schema 14). Die Veresterung der freien Säure (a) und die Acylierung der tertiären OH-Gruppe (f) bzw. Hydrolyse der bereits acetylierten OH-Gruppe (e) gelangen nicht. Untersucht wurden vier verschiedene Enzyme PLE, PCL, PPL und CCL. Von denen weist nur PLE enzymatische Aktivität gegenüber den Benzilsäureestern auf. PLE hat neben der großen Substratbreite, die in diesen Experimenten bestätigt werden konnte, weitere Vorteile. PLE ist preiswert, stabil und benötigt keine Coenzyme. Die im Handel erhältliche PLE besteht aus einer Mischung von Isoenzymen, welche gleiche Stereospezifitäten aufweisen. Aufgrund dieser Eigenschaft wird PLE in der asymmetrischen Synthese als ein einheitliches Enzym eingesetzt [70].

Entscheidend für die Hydrolysegeschwindigkeit von Benzilaten unter Verwendung des Enzyms PLE ist die Alkoholkomponente des Esters. Die aromatischen Substituenten besitzen einen kleinen, aber messbaren Einfluss auf die Hydrolysegeschwindigkeit.

Alkoholkomponente. 3-Piperidyl- (d), 4-Piperidyl- (e) und Methyl benzilat (b) wurden enzymatisch hydrolysiert (Schema 14). Zur Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes greift PLE (Hydrolase vom Serintyp) mit der OH-Gruppe des Serinrestes den Carbonylsauerstoff

der Säure an [71]. Sterische Effekte oder eine herabgesetzte Reaktivität des Carbonylsauerstoffs können die Ursache für eine nicht erfolgte oder nur mäßige Umsetzung sein. Erfahrungsgemäß werden Ester primärer kurzkettiger Alkohole (z. B. Methanol) besonders gut durch PLE hydrolysiert. Der für das Enzym räumlich gut zugängliche Carbonylsauerstoff ist vielleicht eine Erklärung. Demnach müsste der Methylester (primärer Alkohol) die höchste Hydrolysegeschwindigkeit aufweisen. Erstaunlich ist, dass Methyl- wie auch 4-Piperidylester (sekundärer Alkohol) in etwa gleiche Hydrolysezeiten (3,8 d und 3,5 d) für die Umsetzung des gesamten Substrates zeigten. Eine weitere Steigerung der Hydrolysegeschwindigkeit wurde für den 3-Piperidylester (sekundärer Alkohol) mit einer vollständigen Hydrolyse des Substrates nach nur 0,6 d beobachtet. Dieser große Unterschied des 3-Piperidylesters gegenüber den anderen Estern könnte auf eine zusätzliche Bindungsstelle zwischen Substrat und Enzym hinweisen. Offensichtlich kommt der isomeren Stellung des Stickstoffatoms im 3-Piperidinol eine besondere Rolle zu, vergleicht man die Hydrolysegeschwindigkeit zwischen 3- und 4-Piperidylester (Schema 14). Möglicherweise werden über den Stickstoff in Position 3 zusätzliche stabilisierende Wasserstoffbrücken im Enzym-Substrat-Komplex aufgebaut. Sterische Effekte durch die in 3- oder 4-Stellung befindliche Methylgruppe kommen ebenfalls in Betracht.

Die beobachtete Resistenz der acylierten tertiären Alkoholstruktur gegenüber enzymatischer Hydrolyse (e) wie auch die nicht erfolgte enzymatische Acylierung der tertiären Alkoholgruppe (f) lassen sich ebenfalls auf sterische Effekte zurückführen. In der Literatur werden zwar Hydrolysen tertiärer Alkohole durch Lipasen wie CCL und PPL beschrieben, aber verlaufen diese aufgrund der räumlichen Abschirmung tertiärer Alkohole meist erschwert.

Aromatische Substitution. Die aromatischen Substituenten zeigen innerhalb einer Estergruppe (Methylester (b), 4-Piperidylester (c), Tab. 14) unterschiedliche Hydrolysegeschwindigkeiten. In der Methylestergruppe wurde beispielsweise die 3,5-Dimethoxyverbindung schneller als die 3-Methoxy- bzw. 4-Methylsulfonylverbindung hydrolysiert. Gleiche Substituenten in der 4-Piperidylestergruppe (c) zeigten eine andere Reihenfolge der Hydrolysegeschwindigkeiten (3-Methoxy > 3,5-Dimethoxy > 4-Methylsulfonyl), so dass eine Korrelation der Hydrolysegeschwindigkeit in Abhängigkeit von der aromatischen Substitution nicht festzustellen war.

Veresterung. Die missglückte enzymatische Veresterung der Benzilsäure (a) muss z. T. auf eine sterische Abschirmung zurückgeführt werden. In der Literatur werden enzymatische Esterbildungen vorwiegend für Säuren mit tertiärem stereogenen Zentrum in α -Stellung beschrieben. Nur wenige Beispiele sind für quartäre stereogene Zentren in α -Stellung der Säure bekannt. Eine alleinige sterische Begründung ist jedoch abzulehnen, da die Umkehrreaktion (Hydrolyse der Benzilsäureester) möglich ist.

Enantioselektivität. PLE zeigte für alle enzymatischen Umsetzungen eine nur geringe Enantioselektivität. Bevorzugt wurde das *S*-Enantiomer umgesetzt. Eine Änderung der Temperatur und des pH-Wertes, Cosolventien, eine vorherige Reinigung der Enzyme oder eine Immobilisierung des Enzyms wie auch eine strukturelle Veränderung des Substrates können sowohl Aktivität als auch die Enantioselektivität drastisch verbessern.

Substratveränderung. Die Enantioselektivität von PLE gegenüber chiralen substituierten α -Hydroxysäureestern ist von der Art der Substituenten in α -Stellung enorm abhängig und wurde für Mandelsäureester untersucht [72]. Ein weitere Arylgruppe in α -Stellung, was der Struktur von Benzilaten entspricht, scheint die Selektivität herabzusetzen ($E = 1,4$). Eine wesentliche höhere Selektivität von $E = 30$ konnte MOORLAG bei der Hydrolyse von α -Allylmandelsäureester registrieren [72]. Der Austausch der α -Arylgruppe durch eine sterisch weniger anspruchsvolle Gruppe erhöht die Enantioselektivität immens.

Offensichtlich besteht ein Zusammenhang zwischen der relativen Größe der α -Substituenten zueinander und der Enantioselektivität der PLE. Für lipasekatalysierte Reaktionen von sekundären Alkoholen und chiralen Carbonsäuren wurden derartige Zusammenhänge dokumentiert [69].

Weitere Enzyme. PCL, CCL und PPL zeigten keine Aktivität bei der Umsetzung von Benzilaten. Da diese Lipasen in der Praxis überwiegend für die Gewinnung von enantiomeren Alkoholen eingesetzt werden [73], wäre selbst bei einer vorhandenen Hydrolyseaktivität für chirale Benzilsäurederivate, eine geringe Enantioselektivität zu erwarten gewesen.

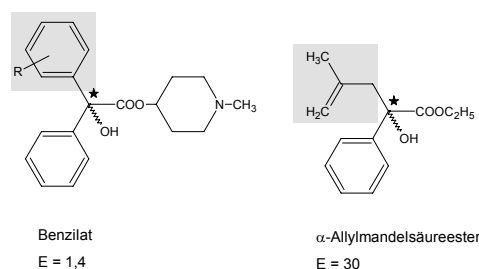


Abb. 15: Enantioselektivität der PLE in Abhängigkeit vom Substrat

3.2 Analytische Charakterisierung

Die Strukturaufklärung und -verifizierung der Synthesestufen und Zielstrukturen wurde vor allem durch NMR-spektroskopische und massenspektrometrische Untersuchungen realisiert. In einigen Fällen konnte die Röntgenkristallstrukturanalyse den Beweis für die Zielstruktur liefern. Die enantiomeren Zielstrukturen wurden zusätzlich durch UV-, CD-/ORD-Spektren, optische Drehung und HPLC charakterisiert. Durch CHN-Analysen und HPLC-Untersuchungen konnte die Reinheit der Zielstrukturen bestätigt werden. Intensive Untersuchungen zur Kernresonanzspektroskopie und Massenspektrometrie racemischer chiraler und achiraler Benzilate wurden von VORWERK [5] durchgeführt. HPLC-Untersuchungen enantiomerer und diastereomerer Benzilate wurden bereits im Kap. 3.1.4 besprochen. Im Rahmen dieser Arbeit sollen insbesondere die analytischen Methoden

- ☐ Polarimetrie,
- ☐ Circular dichroismus/Optische Rotationsdispersion,
- ☐ NMR-Spektroskopie und
- ☐ Kapillarelektrophorese

zur Charakterisierung der Stereoisomeren diskutiert werden. Ferner werden die Ergebnisse der Röntgenkristallstrukturanalyse besprochen, da hierdurch Aussagen zu den bevorzugten Konformationen von N-Methyl-4-piperidyl benzilaten möglich sind.

3.2.1 Polarimetrie

Ein Beweis für das Vorliegen einer enantiomeren bzw. enantiomer angereicherten Verbindung ist das Auftreten optischer Aktivität. Hierzu wurden polarimetrische Untersuchungen in methanolischen oder ethanolischen Lösungen der enantiomeren Benzilate bei 589,3 nm (Na-D Linie) und 20°C durchgeführt. Die spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20}$ wurde aus dem gemessenen Drehwinkel α berechnet:

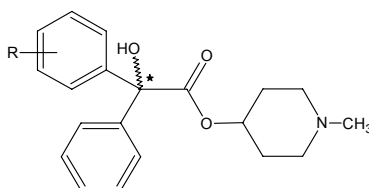
$$[\alpha]_D^{20} = \frac{100 \cdot \alpha}{c \cdot l}$$

α : gemessener Drehwinkel [°]
 c : Konzentration der Lösung [g/100 ml]
 l : Schichtdicke [dm]

In Abhängigkeit von der Substitution des aromatischen Systems (3-Methoxy- und 3,5-Dimethoxy-) lässt sich eine Änderung des Vorzeichens der optischen Drehung konstatieren

(Tab. 16). Dieser Effekt ist nicht außergewöhnlich, da der Drehsinn von Parametern wie Lösungsmittel, Temperatur und Wellenlänge beeinflusst werden kann. Selbst eine Konzentrationsänderung (z. B. Äpfelsäure) kann einen gegensätzlichen Drehsinn hervorrufen. Das Ableiten der absoluten Konfiguration in Anlehnung an den Drehsinn ist somit nicht möglich. Auffällig sind die kleinen optischen Drehwerte für chirale N-Methyl-4-piperidyl benzilate (Tab. 16). Die Enantiomere der *tert*-Butyl- und n-Butylverbindung zeigen sogar unter den beschriebenen Bedingungen keine optische Aktivität (cryptochiral). Das kann zum Teil auf die begrenzte Messgenauigkeit des Polarimeters zurückgeführt werden. Infolge einer nicht registrierten optischen Aktivität kann fälschlicherweise der Eindruck entstehen, dass ein Racemat vorliegt. Dieser Umstand erklärt die dokumentierten Schwierigkeiten der Racemattrennung von Benzilaten wie im Fall von 4-Methoxybenzilsäure (nur $[\alpha]_D^{18} = \pm 1,2^\circ$ (c = 2,52, Dioxan) [74]. Verbindungen mit inhärenter Cryptochiralität können durch Aufnahme von CD-/ORD-Spektren als solche identifiziert werden.

Tab. 16: Spezifische Drehung enantiomerer Benzilate



Substitution R	Spezifische Drehung* $[\alpha]_D^{20}$	Vorzeichen der spezifischen Drehung $[\alpha]_D^{20}$			
		R^{**}		S^{**}	
4- <i>tert</i> -Butyl-	keine opt. Drehung messbar	n. b.	(1)	n. b.	(2)
4-n-Butyl-	keine opt. Drehung messbar	n. b.	(3)	n. b.	(4)
4-Butoxy-	$\pm 1,2^\circ$ (c = 0,82, Methanol)	(-)	(5)	(+)	(6)
4-Trifluormethoxy-	$\pm 8,3^\circ$ (c = 0,84, Methanol)	(-)	(9)	(+)	(10)
4-Trifluormethyl-	$\pm 16,8^\circ$ (c = 2, Ethanol)	(-)	(11)	(+)	(12)
3-Methoxy-	$\pm 4,5^\circ$ (c = 5,2, Ethanol)	(+)	(15)	(-)	(16)
3,5-Dimethoxy-	$\pm 6,0^\circ$ (c = 0,65, Methanol)	(+)	(13)	(-)	(14)
4-Methylsulfonyl-	$\pm 21,1^\circ$ (c = 1,1, Methanol)	(-)	(17)	(+)	(18)

* Konzentration c [g/100 ml], Lösungsmittel in Klammer

** Verbindungs-Nr. in Klammer

3.2.2 Circulardichroismus (CD) und Optische Rotationsdispersion (ORD)

Zur näheren Charakterisierung und Identifizierung enantiomerer Benzilate mit geringen Drehwerten bzw. cryptochiralen Eigenschaften wurden CD-Spektren aufgenommen. Beim Circulardichroismus wird die Eigenschaft optisch aktiver Verbindungen ausgenutzt, rechts und links polarisiertes Licht unterschiedlich zu absorbieren [75, 76]. Voraussetzung für die Aufnahme von CD-Spektren sind daher chromophore Gruppen. Geeignete chromophore Gruppen der Benzilate sind die Phenylgruppen, die durch drei Absorptionsbanden (Absorptionsbanden des Benzens: 184 nm: β -Bande, 198 nm: p-Bande, 255 nm: α -Bande) charakterisiert sind.

Insbesondere wurden die enantiomeren Absorptionsunterschiede zwischen 250 und 300 nm betrachtet. Die Banden in diesem Bereich (α -Bande) sind auf π -Elektronenübergänge der Phenylsubstituenten zurückzuführen und durch eine feine Strukturierung gekennzeichnet. CD-Maxima oder -Minima korrelieren im Wellenlängenbereich in etwa mit den Absorptionsmaxima des UV-Spektrums. Sauerstoffhaltige Substituenten am Aromaten führen zu einer bathochromen Verschiebung, was deutlich in den CD-Spektren von 3-Methoxy- (**15**, **16**) und 3,5-Dimethoxybenzilat (**13**, **14**) zu erkennen ist. Alkylsubstituenten und 4-Trifluormethylsubstituenten zeigen ähnliche CD-Maxima wie die unsubstituierten Benzilsäureester (252, 258, 264 und 268 nm) im UV-Spektrum (Abb. 16). Die Absorptionsunterschiede von *R*- und *S*-konfiguriertem, cryptochiralem N-Methyl-4-piperidyl 4-*tert*-butylbenzilat (**1/2**) resultieren in spiegelbildlichen CD-Spektren (Abb. 16). Dies beweist eindeutig das Vorhandensein optischer Aktivität und somit das Vorliegen zweier Enantiomere. Der Zusammenhang zwischen Molarer Elliptizität $[\theta]$ ($\text{Grad}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{decimol}^{-1}$) und dem molaren Absorptionskoeffizienten ϵ ist: $[\theta] = 3298,2 \cdot \Delta\epsilon$, wobei $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$ (ϵ_L , ϵ_R : molare Absorptionskoeffizienten für links- und rechtscircular polarisiertes Licht ($\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)) darstellt.

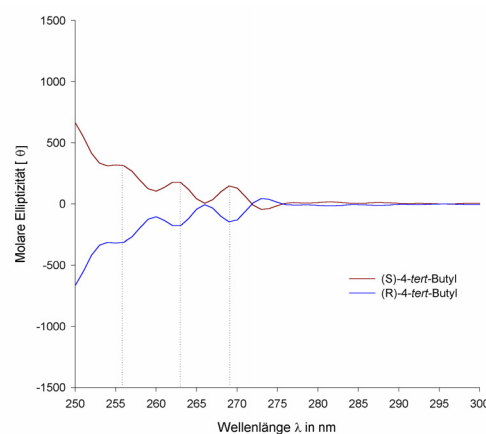


Abb. 16: CD-Spektren von (*R*)- und (*S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-*tert*-butylbenzilat (**1/2**)

Das Vorzeichen der CD-Kurve wird durch die absolute Konfiguration des Benzilates bestimmt. Hierbei wurde für die untersuchten Benzilate im Bereich von 250 bis 300 nm immer eine negative CD-Kurve für die *R*-konfigurierten Verbindungen (**1**, **11**, **15**, **17**) erhalten, analog dazu eine positive für die *S*-Enantiomere (**2**, **6**, **10**, **14**). Trotzdem ist ein Herleiten der absoluten Konfiguration von Benzilaten basierend auf dem Vorzeichen der CD-Kurve strikt abzulehnen. So belegen CD-Untersuchungen (230 bis 290 nm) von (*R*)- α -Phenylethylalkohol, dass bereits die Stellung eines Chlorsubstituenten (o-, m- oder p) das Vorzeichen der CD-Kurve verändert [77].

STANCHEVS Bemühungen, die absolute Konfiguration von Benzhydroderivaten auf Grundlage des längstwelligsten Cotton-Effektes der α -aromatischen Bande abzuleiten, konnte auf Benzilate nicht übertragen werden [78].

Die Abhängigkeit der optischen Drehung von der Wellenlänge wird in ORD-Spektren dargestellt. Unter Anwendung der Kronig-Kramer-Gleichung (Beziehung zwischen Absorption und Refraktion) können aus den CD-Spektren die ORD-Spektren erhalten werden.

Der Verlauf der ORD-Kurve in Abb. 17 zeigt für das *S*-Enantiomer der 4-Butoxyverbindung (**6**) eindeutig, dass Betrag und Vorzeichen der optischen Drehung entscheidend von der Wellenlänge abhängen. Zu kleineren Wellenlängen nimmt der Betrag der optischen Drehung zu. Verbindungen mit keiner messbaren Drehung bei 589 nm (N-Methyl-4-piperidyl 4-*tert*-butylbenzilat) bzw. geringer optischen Aktivität (N-Methyl-4-piperidyl 4-butoxybenzilat) sollten daher bei kürzeren

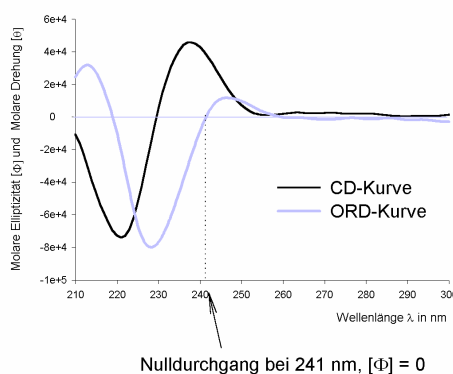


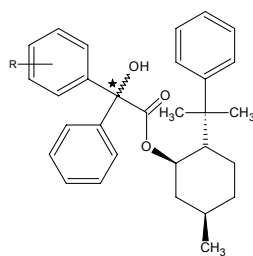
Abb. 17: CD- und ORD-Kurven von (*S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-butoxybenzilat (**6**), $[\theta]$ und $[\phi]$ ($\text{Grad}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{decimol}^{-1}$)

Wellenlängen vermessen werden. Jedoch kann auch bei kürzeren Wellenlängen optische Inaktivität auftreten. Wenn die optische Drehung in Abhängigkeit von der Wellenlänge das Vorzeichen ändert, kommt es zu einem Nulldurchgang (optische Inaktivität). Beispielsweise ist für **6** ein positiver Cotton-Effekt mit einem Nulldurchgang ($\phi = 0$) bei 241 nm zu verzeichnen (Abb. 17). Derartige Nulldurchgänge befinden sich nahe eines UV- bzw. CD-Maximums.

3.2.3 Kernresonanzspektroskopie

Neben der Struktursicherung der Syntheseprodukte wurden NMR-spektroskopische Methoden zur Unterscheidung diastereomerer Verbindungen herangezogen. Insbesondere wurde die Anwendbarkeit der NMR-Spektroskopie auf die Bestimmung der diastereomeren Zusammensetzung von (-)-8-Phenylmenthyl- und (-)-Menthyl benzilaten untersucht. In den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren konnten unterschiedliche chemische Verschiebungen für diastereomere Benzilate registriert werden. Besser geeignet für quantitative Aussagen zur diastereomeren Zusammensetzung ist die ^1H -NMR-Spektroskopie. Eine wichtige Voraussetzung dafür ist, dass die untersuchten Protonensignale von anderen nicht überlagert werden. Die Signale der Phenylprotonen des (-)-8-Phenylmenthyl benzilates (Ring A, B und C, Abb. 18) liegen im Bereich von 6,3 bis 8,1 ppm. Meist ist hier eine Interferenz der einzelnen Absorptionsbanden zu beobachten. Weiterhin ist der Bereich von 0,7 bis 2,0 ppm durch eine Anhäufung von überlagerten Protonensignalen des Phenylmenthylrestes wie CH_2 - (Cyclohexanrings) und CH_3 -Protonen gekennzeichnet. Die besten Voraussetzungen für eine quantitative Auswertung bringen die Signale der Substituenten am aromatischen System (Ring A und B, Abb. 18) mit sich, sofern diese Protonen enthalten (Bereich 2,34 bis 3,92 ppm). Die Differenz der chemischen Verschiebungen liegt bei ca. $\Delta\delta_{\text{H}} = 0,1$ ppm (Tab. 17). Alle Signale werden bis zur Basislinientrennung aufgelöst, so dass durch Integration der Signalflächen die diastereomere Zusammensetzung hervorragend ermittelt werden kann. Im Vergleich dazu betrugen die $\Delta\delta_{\text{H}}$ -Werte der (-)-Menthylester nur 0,02 bis 0,04 ppm (Tab. 18). Eine Identifizierung der Stereoisomeren von (-)-Menthyl benzilaten ist möglich. Da die Signale jedoch nicht vollständig aufgelöst sind, können keine exakten quantitativen Aussagen zur Zusammensetzung des Diastereomerengemisches von (-)-Menthyl benzilaten getroffen werden.

Tab. 17: Chemische Verschiebungen relevanter Substituentenprotonen von (-)-8-Phenylmenthyl benzilaten

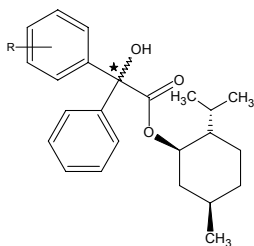


Substitution R (Verbindungs-Nr.)	Chemische Verschiebung der Protonen in R δ_H [ppm]*	Art der Protonensignale in R	Differenz der chemischen Verschiebung $\Delta\delta_H$ [ppm] zwischen R und S*
4- <i>tert</i> -Butyl-	(40) <i>R</i> 1,17	9H, 3 x CH ₃ (s)	0,1
	(30) <i>S</i> 1,27		
4-Methylsulfonyl-	(44) <i>R</i> 2,91	3H, CH ₃ (s)	0,1
	(39) <i>S</i> 3,01		
4-Methylmercapto-	(41) <i>R</i> 2,34	3H, CH ₃ (s)	0,1
	(31) <i>S</i> 2,44		
3-Methoxy-	- <i>R</i> 3,66**	3H, CH ₃ (s)	0,08
	(38) <i>S</i> 3,74		
4-n-Butyl-	(42) <i>R</i> 2,46	2H, CH ₂ (t)	0,1
	(32) <i>S</i> 2,56		
4-Butoxy-	(43) <i>R</i> 3,82	2H, CH ₂ (t)	0,1
	(33) <i>S</i> 3,92		
4-Dimethylamino-	- <i>R</i> 2,82**	6H, 2 x CH ₃ (s)	0,1
	(34) <i>S</i> 2,92		

* *R*- und *S*-Konfiguration bezieht sich auf das asymmetrische C-Atom im Benzilsäureteil

** δ_H für (-)-8-Phenylmenthyl (*R*)-benzilat wurde dem ¹H-NMR-Spektrum des Diastereomerenpaares (-)-8- Phenylmenthyl (*R,S*)-benzilat entnommen

Tab. 18: Chemische Verschiebungen relevanter Substituentenprotonen von (-)-Menthyl benzilaten



Substitution R (Verbindungs-Nr.*)	Chemische Verschiebung der Protonen in R δ_H [ppm]**	Art der Protonensignale in R	Differenz der chemischen Verschiebung $\Delta\delta_H$ [ppm] zwischen R und S***
4- <i>tert</i> -Butyl- (87)	1,22 1,25	9H, 3 x CH ₃ (s)	0,03
4-Methylsulfonyl- (86)	2,97 3,00	3H, CH ₃ (s)	0,03
3-Methoxy- (84)	3,68 3,70	3H, CH ₃ (s)	0,02
4-Dimethylamino- (82)	2,85 2,89	6H, 2 x CH ₃ (s)	0,04

* Die Verbindungs-Nr. bezieht sich auf das Diastereomerenmisch

** eine Zuordnung der chemischen Verschiebung zur R- oder S-konfigurierten Benzilsäure ist bei den (-)-Menthylestern nicht erfolgt

*** R- und S-Konfiguration bezieht sich auf das asymmetrische C-Atom im Benzilsäureteil

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass Aussagen zur absoluten Konfiguration des stereogenen Zentrums im Benzilsäuremolekül der (-)-8-Phenylmenthylester in Abhängigkeit von der chemischen Verschiebung δ_H möglich sind. Durch die R-Konfiguration werden im Vergleich zum S-Enantiomer die Protonensignale des Substituenten der (-)-8-Phenylmenthyl benzilate um ca. 0,1 ppm ins Hochfeld verschoben. Für die stereochemische Anordnung der Phenylringe des (-)-8-Phenylmenthyl benzilates bedeutet dies, dass der substituierte Ring B des Benzilsäurerestes sich im Abschirmungskegel (+Anisotropie-Effekt) des Phenylrings C (Phenylmenthylrest) befindet (Abb. 18).

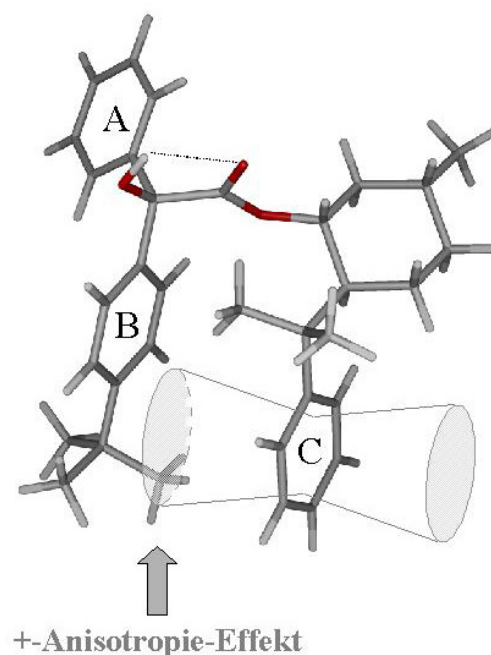


Abb. 18: Anisotropie-Effekt als Ursache der Hochfeldverschiebung für *R*-konfigurierte Benzilate am Beispiel des (-)-8-Phenylmenthyl (*R*)-4-*tert*-butylbenzilate

Eine Bedingung dafür ist, dass die Carbonylgruppe und die tertiäre Alkoholgruppe *syn* zueinander stehen. Diese Konformation kann durch eine intramolekulare Wasserstoffbrücke von der OH-Gruppe zum Carbonylsauerstoff stabilisiert werden und wird auch im kristallinen Zustand von den Benzilaten bevorzugt (*syn*-/*anti*-Konformation, Schema 15). Derartige Anisotropie-Effekte werden zur Bestimmung der absoluten Konfiguration chiraler Alkohole in ^1H -NMR-Anisotropie-Methoden angewendet. HARADA setzte beispielsweise die 2-Methoxy-2-(1-naphthyl)propionsäure als chirales Reagenz ein, um diastereomere Ester aus den chiralen Alkoholen zu erhalten. Der starke Anisotropie-Effekt der Naphthylgruppe wird zur Unterscheidung der Diastereomere herangezogen [79]. KOSAKA konnte die ^1H -NMR-Anisotropie-Methode zur Konfigurationsbestimmung auf chirale substituierte Diphenylmethanole erfolgreich übertragen [80].

3.2.4 Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese (CE) stellt eine weitere Methode zur Bestimmung der optischen Reinheit dar. An sich handelt es sich bei der CE um eine achirale analytische Methode. Erst durch Zusatz chiraler Auxiliare kann eine Enantiomerendiskriminierung erfolgen [81, 82, 83, 84].

Die Enantiomerentrennung von (*R,S*)-N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (**79**) wurde unter Verwendung verschiedener Cyclodextrine (CD), z. B. Hydroxypropyl- γ -CD [85], Methyl- β -CD [86, 87], Carboxymethyl- β -CD (Na-Salz) [88] untersucht. Eine Trennung in die Enantiomere konnte nur durch Carboxymethyl- β -CD (Na-Salz) erreicht werden (Abb. 19).

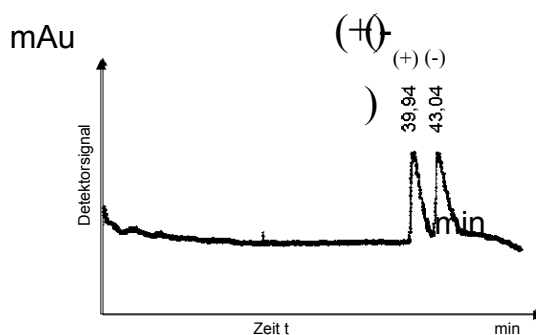


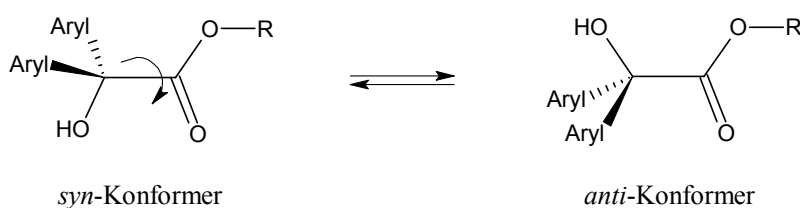
Abb. 19: Enantiomerentrennung von (\pm)-(*R,S*)-N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat mittels CE

3.2.5 Röntgenkristallstrukturanalyse

Für sechs Verbindungen der gewünschten Zielstrukturen konnte eine Röntgenkristallstrukturanalyse durchgeführt werden. Hierdurch wurden die Strukturen dieser Vertreter eindeutig bewiesen. Die Bestimmung der absoluten Konfiguration war in keinem Fall möglich. Die durch Röntgenkristallstrukturanalyse erhaltenen Konformationen der basischen Benzilate können folgendermaßen charakterisiert werden.

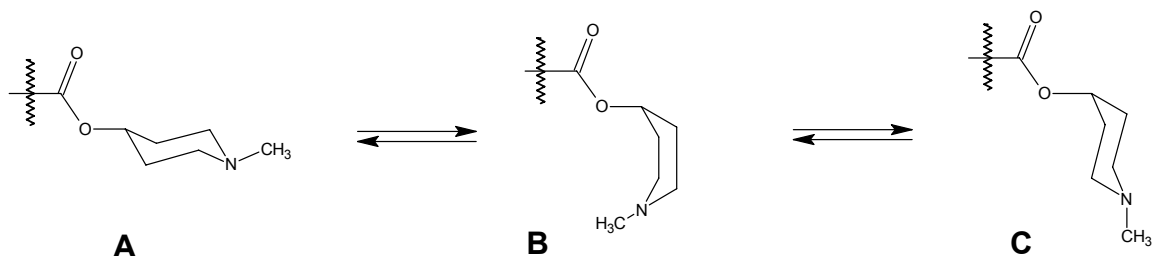
Stellung der Phenylringe. Für die Phenylringe wird in allen Beispielen eine Tendenz zur perpendicularen Anordnung beobachtet.

Stellung der tertiären OH-Gruppe zur Estercarbonylgruppe. Durch Rotation um eine Einfachbindung lassen sich die *syn*- und *anti*-Konformere ineinander überführen (Schema 15). Beide Konformationen können über Wasserstoffbrücken von der tertiären OH-Gruppe entweder zum Carbonylsauerstoff (*syn*) oder zum Ethersauerstoff (*anti*) stabilisiert werden. Die *syn*-Konformation wird von den N-Methyl-4-piperidyl benzilaten in kristallisierter Form bevorzugt (Tab. 19).



Schema 15: *syn*- und *anti*-Konformere

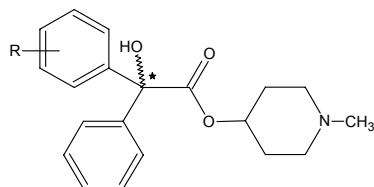
Konformation des N-Methyl-4-piperidylrings. Bei den Strukturen **A** bis **C** (Schema 16) handelt es sich um Rotationskonformere. Die Sesselkonformation **A** gelangt über die Wannenform **B** wieder in eine stabilere Sesselkonformation **C**.



Schema 16: Übersicht zu den Konformationen des N-Methyl-4-piperidylrings

Die Röntgenkristallstrukturen bestätigen, dass Konformation **A** und **C** gleichermaßen bei den N-Methyl-4-piperidyl benzilaten im kristallinen Zustand anzutreffen sind (Tab. 19).

Tab. 19: Konformationen der N-Methyl-4-piperidyl benzilate



Substitution R (Verbindungs-Nr.)	Stellung der OH-Gruppe*	Konformation des Piperidylrings**	Abbildung
4- <i>tert</i> -Butyl- (72)	<i>anti</i>	A	20
4-Trifluormethyl- (77)	<i>anti</i>	A	21
4-Trifluormethoxy- (76)	<i>syn</i>	C	22
3-Methoxy- (79)	<i>syn</i>	C	23
3,5-Dimethoxy- (78)	<i>syn</i>	A	24
4-Methylsulfonyl- (80)	<i>syn</i>	C	25

* Schema 15, ** Schema 16

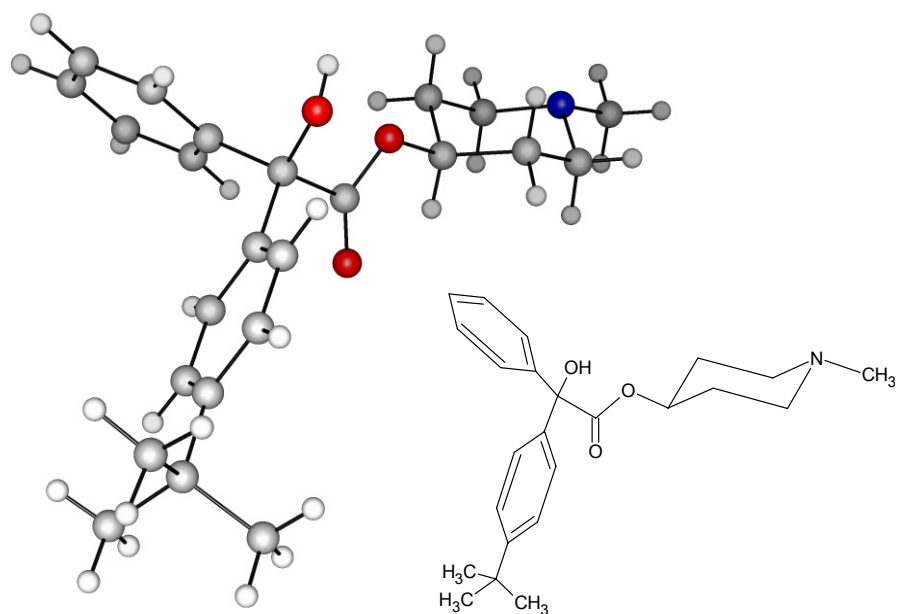


Abb. 20: Röntgenkristallstruktur von N-Methyl-4-piperidyl 4-*tert*-butylbenzilat (**72**)

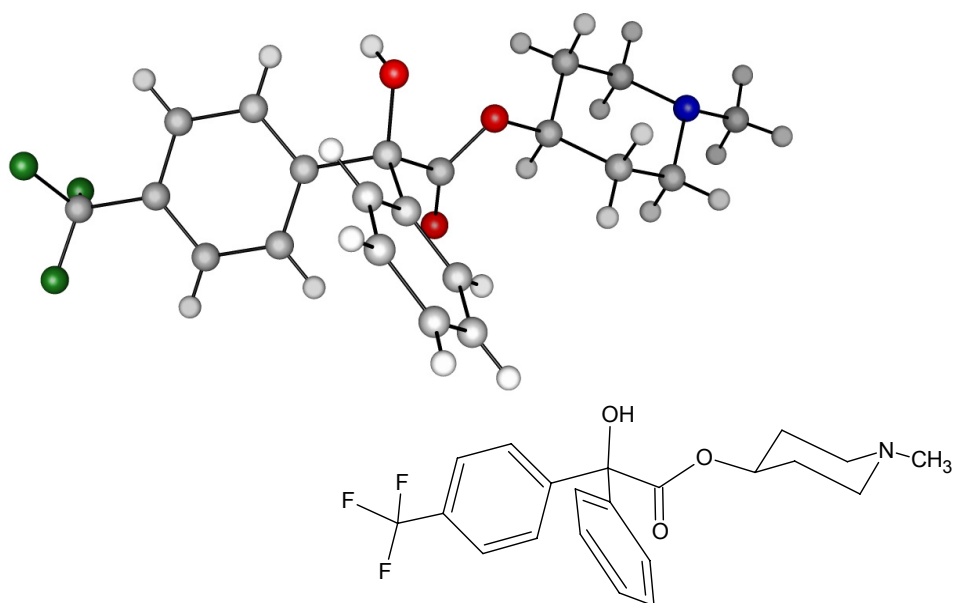


Abb. 21: Röntgenkristallstruktur von N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethylbenzilat (**77**)

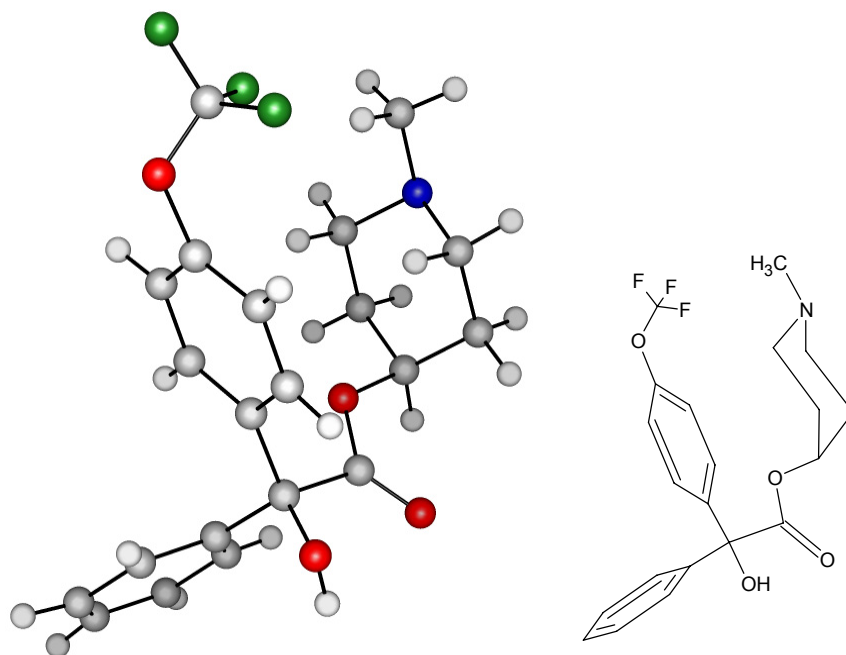


Abb. 22: Röntgenkristallstruktur von N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethoxybenzilat (**76**)

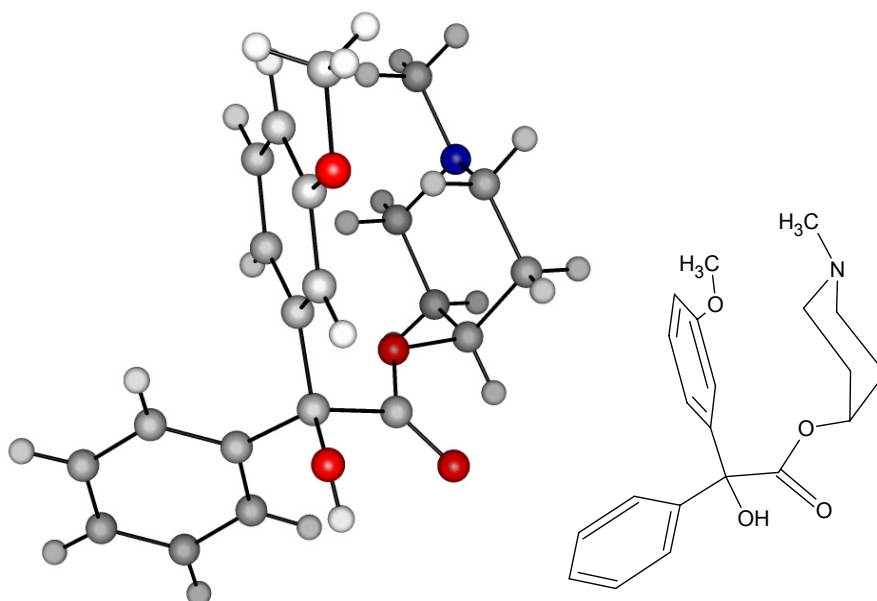


Abb. 23: Röntgenkristallstruktur von N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (**79**)

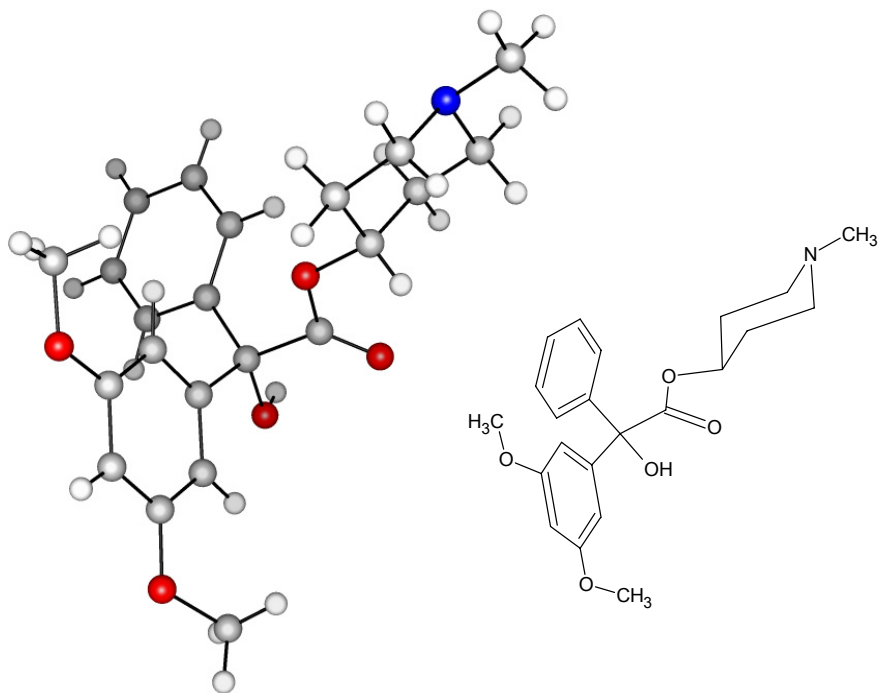


Abb. 24: Röntgenkristallstruktur von N-Methyl-4-piperidyl 3,5-dimethoxybenzilat (**78**)

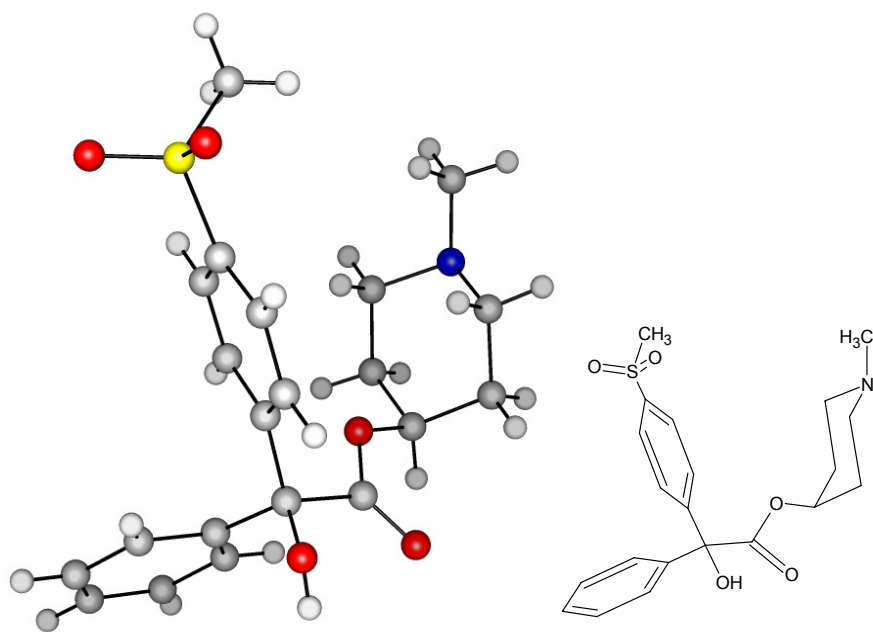


Abb. 25: Röntgenkristallstruktur von N-Methyl-4-piperidyl 4-methylsulfonylbenzilat (**80**)

3.2.6 Diskussion

Neue Erkenntnisse zu chiroptischen Eigenschaften und Konformationstendenzen von N-Methyl-4-piperidyl benzilaten konnten durch die untersuchten Methoden gewonnen werden. Besonders hervorzuheben ist, dass mit der NMR-Spektroskopie eine Methode für Benzilate gefunden wurde, die Aussagen zur absoluten Konfiguration unabhängig von enantiomeren Referenzsubstanzen zulässt.

Polarimetrie. Durch Messung der optischen Aktivität mittels Polarimetrie können enantiomere Benzilate charakterisiert werden. Bemerkenswert ist die für zwei Vertreter gefundene und selten auftretende Cryptochiralität. Aufgrund der kleinen Drehwerte und der mitunter bestehenden Cryptochiralität eignet sich die Polarimetrie jedoch nicht als alleinige Methode für die qualitative und quantitative Bestimmung enantiomerer Benzilate.

CD/ORD-Methoden. Die Aufnahme von CD-/ORD-Spektren ermöglicht es, enantiomere Benzilate mit cryptochiralen Eigenschaften bei 589 nm zu detektieren. Durch Messung des Drehsinns bei 589 nm wird die optische Aktivität von Benzilaten nicht immer erkannt. Die berechneten ORD-Kurven zeigen, dass die optische Drehung für Benzilate mit niedrigen oder nicht mehr bestimmbaren Drehwerten bei 589 nm bei kürzeren Wellenlängen vermessen werden sollte, um eine messbare optischen Drehung zu erhalten. Das Herleiten der absoluten Konfiguration in Anlehnung an das Vorzeichen der CD-Kurve ist nicht möglich, obwohl die untersuchten *R*-Enantiomere immer durch negative bzw. die *S*-Enantiomere durch positive CD-Kurven (250-300 nm) gekennzeichnet sind.

NMR-Spektroskopie. Die ^1H -NMR-Spektroskopie eignet sich hervorragend zur Unterscheidung von diastereomeren Benzilaten (Phenylmenthyl- und Menthyl benzilate). Dagegen ist eine quantitative Auswertung der Diastereomerenzusammensetzung nur für (-)-8-Phenylmenthyl benzilate möglich, weil hier die Protonensignale der Substituenten optimal aufgelöst werden. Den größten Nutzen birgt die NMR-Spektroskopie für die Bestimmung der absoluten Konfiguration des asymmetrischen C-Atoms im Benzilsäurerest. Alle bisherigen untersuchten Methoden (direkte HPLC-Methoden, optische Drehung, CD/ORD, CE) eignen sich zwar zur Differenzierung von enantiomeren Benzilaten, aber nicht für das Ableiten der absoluten Konfiguration. Für die genannten Methoden ist eine Bestimmung der absoluten Konfiguration nur möglich, wenn eine enantiomere Referenzsubstanz mit bekannter Konfiguration eine eindeutige Zuordnung erlaubt. Im ^1H -NMR-Spektrum gelingt die Zuordnung von *R*- und *S*-Konfiguration des

zentralen asymmetrischen C-Atoms im Diastereomergemisch durch Vergleich der chemischen Verschiebungen der Protonen der Arylsubstituenten. Diastereomere (-)-8-Phenylmenthyl benzilate mit *R*-Konfiguration im Benzilsäurerest zeigen im Vergleich zur *S*-Konfiguration für die Protonen des Substituenten eine Hochfeldverschiebung (Tab. 17, Abb. 18)

Röntgenkristallstrukturanalyse. Aufgrund der guten Kristallisationsneigung von Benzilaten in Diethylether ist es gelungen, Kristalle für die Röntgenkristallstrukturanalyse zu züchten. Dadurch konnte die gesamte Molekülgeometrie der kristallinen Verbindungen aufgeklärt werden. Offensichtlich wird die *syn*-Konformation im kristallinen Zustand bevorzugt. Ein Indiz dafür, dass die *syn*-Konformation auch in Lösung begünstigt wird, ist das Modell für die Hochfeldverschiebung des *R*-konfigurierten Benzilsäurerestes in (-)-8-Phenylmenthyl benzilaten. Eine Hochfeldverschiebung ist nur unter der Voraussetzung der *syn*-Konformation von Estercarbonylsauerstoff und tertiärer OH-Gruppe plausibel.

3.3 Stabilitätsuntersuchungen: Racemisierung/Epimerisierung

Für die Entwicklung neuer potenzieller Arzneistoffe und ihre spätere therapeutische Anwendung sind Stabilitätsuntersuchungen unerlässlich. Abbaureaktionen von Arzneistoffen sind durch komplexe Vorgänge (chemisch, physikalisch und mikrobiell) gekennzeichnet. Stereochemische Veränderungen (Racemisierung/Epimerisierung) müssen speziell bei enantiomeren/diastereomeren Verbindungen geklärt werden. Daher soll in einigen Versuchen die Tendenz des zentralen asymmetrischen C-Atoms im Benzilatmolekül zur Konversion untersucht werden.

3.3.1 Stabilität in wässriger Lösung

Zur Untersuchung der Stabilität wurden Lösungen von (*R*)-*N*-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (**15**) in einem pH-Bereich von 2,02 bis 9,03 hergestellt und 15 h bei 80°C im Klimaschrank aufbewahrt. Anschließend wurden die Lösungen mittels HPLC auf den Grad ihrer Racemisierung untersucht. Racemisierungsprozesse wurden hierbei zunächst nicht festgestellt (Tab. 20).

Tab. 20: Untersuchungen zur Racemisierung von (*R*)-N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (**15**) im pH-Bereich von 2 bis 9 bei einer Temperatur von 80°C

Lösung	Phosphat-Pufferlösung	Gemessener pH-Wert der Pufferlösung	Cosolvens Acetonitril, Konzentration [%V/V]	Enantiomerenverhältnis [%] <i>S</i> : <i>R</i>
I	pH 2,0 R, (EAB 2000)	2,02	0	0:100
II	pH 4,5 R, (DAB 1998)	4,25	0	0:100
III	pH 7,0 R, (EAB 2000)	7,01	50	0:100
IV	pH 9,0 R, (EAB 2000)	9,03	50	0:100

3.3.2 Stabilität von N-Methyl-4-piperidyl-, (-)-Menthyl- und (-)-8-Phenylmenthyl benzilaten im schwefelsauren Milieu

Racemisierung. Weitergehende Stabilitätstests von **15** wurden in verschiedenen Konzentrationen an Schwefelsäure durchgeführt. Die in Schwefelsäure gelöste Verbindung **15** wurde 1 h bei 20°C geschüttelt und anschließend weitere 10 min erwärmt (70°C) (Tab. 21). Eine fortgeschrittene Racemisierung (42:58) konnte bei 20°C erst unter Verwendung von 48 %iger Schwefelsäure nach 1 h Schütteln festgestellt werden. Nach zusätzlichem zehnminütigen Erwärmen (70°C) zeigten sich schon bei 24 %iger Schwefelsäure erste Racemisierungstendenzen (3:97).

Tab. 21: Verlauf der Racemisierung von (*R*)-N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (**15**) im schwefelsauren Milieu

Zeit t	Konzentration der Schwefelsäure [%]	Enantiomerenverhältnis [%] <i>S</i> : <i>R</i>
60 min (20°C)	6	0:100
	12	0:100
	24	0:100
	48	42:58
70 min (60 min 20°C, 10 min 70°C)	6	0:100
	12	0:100
	24	3:97
	48	48:52

Epimerisierung. Die Untersuchungen wurden auf jeweils ein Diastereomer von (-)-Menthyl 3,4-dimethoxybenzilat und (-)-8-Phenylmenthyl 3-methoxybenzilat ausgeweitet (Tab. 22). Ändert sich die Konfiguration eines von mehreren stereogenen Zentren im Molekül, wird der Vorgang als Epimerisierung bezeichnet [89].

Tab. 22: Verlauf der Epimerisierung von (-)-Menthyl 3,4-dimethoxybenzilat (Peak 1)* **A** und (-)-8-Phenylmenthyl (*S*)-3-methoxybenzilat **B** im schwefelsauren Milieu

Zeit t	Konzentration der Schwefelsäure [%]	Diastereomerenverhältnis [%]	
		A**	B***
		Peak 1 : Peak 2	S:R
60 min (20°C)	6	100:0	100:0
	12	100:0	100:0
	24	100:0	100:0
	48	80:20	100:0
70 min (60 min 20°C, 10 min 70°C)	48	71:29	100:0

* da die Zuordnung der absoluten Konfiguration nicht erfolgt ist, wird entsprechend der Elutionsreihenfolge der HPLC-Methode (Kap. 3.1.4.2) Peak 1 und Peak 2 verwendet

** die Diastereomerenzusammensetzung wurde mittels HPLC bestimmt (Kap. 3.1.4.2)

*** die Diastereomerenzusammensetzung wurde mittels NMR bestimmt (Kap. 3.2.3)

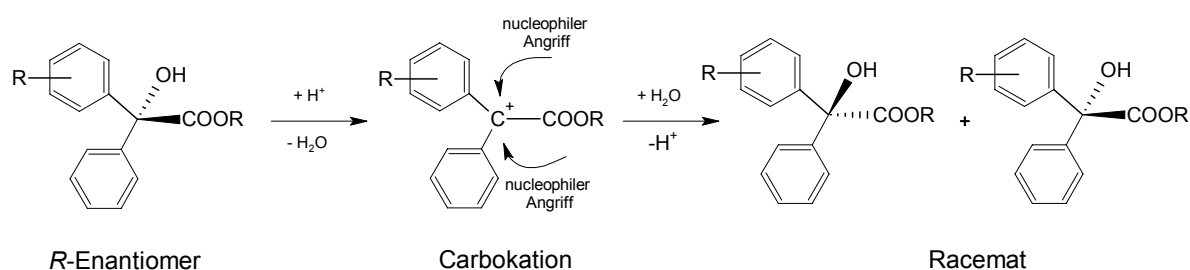
Das Diastereomer des (-)-Menthylesters (Peak 1) zeigt im Vergleich zum N-Methyl-4-piperidylester (**15**) eine geringere Tendenz zur Konversion des asymmetrischen C-Atoms des Benzilsäurerüsts. Erst in 48 %iger Schwefelsäure sind bei 20°C Konversionstendenzen (80:20) sichtbar (A, Tab. 22). Wird der (-)-Menthylrest durch einen (-)-8-Phenylmenthylrest (**38**) im Benzilatmolekül ausgetauscht, lässt sich selbst nach weiteren 10 min Erwärmen (70°C) im stark schwefelsauren Milieu keine Konversion mehr registrieren (B, Tab. 22).

Gleichgewichtseinstellung. Die Konversion eines stereogenen Zentrums von Diastereomeren führt nicht, wie bei Enantiomeren, zu gleichen Anteilen *R* und *S* am asymmetrischen C-Atom. Das thermodynamisch stabilere Diastereomer überwiegt [90]. Wird bei den Epimerisierungsversuchen eines Diastereomers ein Verhältnis von beispielsweise 71:29 (Tab. 22) gefunden, kann ein solches Verhältnis auf eine Gleichgewichtseinstellung hindeuten, bei der sich das energetisch günstigere Diastereomer anreichert. Um eine derartige Gleichgewichtseinstellung als dominierende

Einflusskomponente für die vorgefundenen Diastereomerenverhältnisse auszuschließen, wurde jeweils das Diastereomeregemisch (-)-Menthyl (*R*)- und (*S*)-3,4-dimethoxybenzilat (1:1) und (-)-8-Phenylmenthyl (*R*)- und (*S*)-3-methoxybenzilat (1:1) den Versuchsbedingungen (48 %ige Schwefelsäure, 60 min 20°C und weitere 10 min 70°C) unterworfen. Nach erfolgter Exposition wurden nahezu gleiche Anteile der Diastereomeren vorgefunden, d. h. bei einer vollständigen Epimerisierung nur eines Diastereomers sollten nahezu gleiche Anteile beider Diastereomere zu erwarten sein. Demzufolge kann für nachfolgende Betrachtungen der Konversion des stereogenen Zentrums im Benzilsäuremolekül eine Gleichgewichtseinstellung, die nicht zu gleichen Anteilen beider Diastereomere führt, vernachlässigt werden.

3.3.3 Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen belegen, dass die synthetisierten Benzilate Racemisierungs-/Epimerisierungsprozessen unterliegen. Die Racemisierung/Epimerisierung vollzieht sich über säurekatalysierte Reaktionsmechanismen. Hierbei kommt es zur Protonierung der tertiären Alkoholstruktur und nachfolgender Abspaltung von Wasser. Als Zwischenprodukt entsteht ein planares Carbokation. Wassermoleküle können das achirale Carbokation gleichermaßen von beiden Seiten nucleophil angreifen (Schema 17). Die Generierung von α -Carbonylcarbokationen aus den alkoholischen Vorstufen unter stark sauren Bedingungen wurde von DAO beschrieben [91], die im Fall enantiomerer/diastereomerer Benzilate zur Racemisierung/Epimerisierung führt.



Schema 17: Säurekatalysierte Racemisierung über ein Carbokation

Aufgrund des säurekatalysierten Reaktionsmechanismus ist verständlich, weshalb keine Racemisierung im alkalischen Milieu beobachtet wurde. Im Übrigen legen die Untersuchungen dar, dass die Tendenz zur Konversion des stereogenen Zentrums in der Benzilsäurestruktur wesentlich von der Alkoholkomponente des Esters bestimmt wird (Diagramm 2). Im Vergleich zum N-Methyl-4-piperidylester **15** (**A**) ist beim Menthylester (Peak 1) (**B**) unter gleichen Reaktionsbedingungen eine deutliche Abnahme der Racemisierung/Epimerisierung des stereogenen Zentrums im Benzilatmolekül zu verzeichnen. Vermutlich wird durch die Isopropylseitenkette des Menthylrestes eine Protonierung der tertiären Alkoholfunktion erschwert, was sich in einer verringerten Konversion der Benzilat-Konfiguration auswirkt. Überraschenderweise wurde beim (-)-8-Phenylmenthylester (**C**) unter den gewählten Bedingungen keine Epimerisierung des *S*-konfigurierten C-Atoms im Benzilsäureteil beobachtet. Eine Gleichgewichtseinstellung, bei der das thermodynamisch stabilere Diastereomer überwiegt oder sogar ausschließlich entsteht, kann hierbei ausgeschlossen werden.

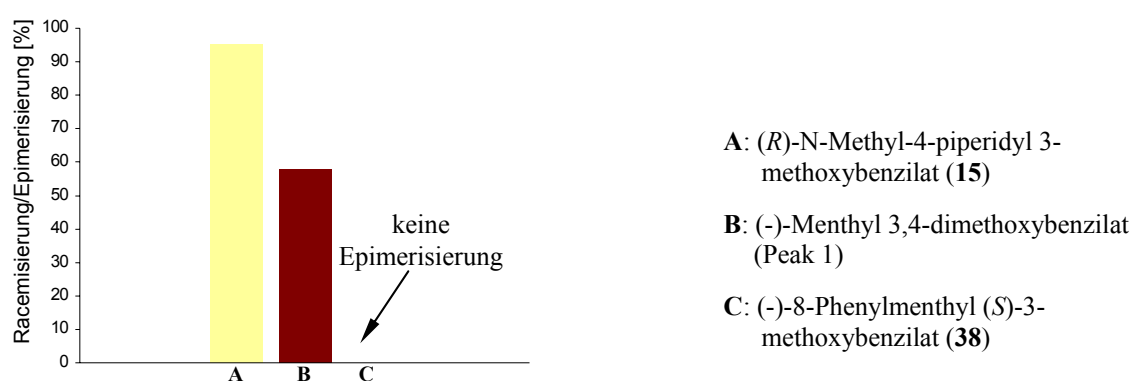


Diagramm 2: Racemisierung von Benzilaten nach 1 h Schütteln (Raumtemperatur) und zehnminütigem Erwärmen (70°C)

Die beobachtete Epimerisierungsresistenz von **38** (c) lässt sich folgendermaßen erklären:

- ☐ eine Zunahme der räumlichen Ausdehnung des Esterrestes (zusätzliche voluminöse Phenylgruppe) verhindert eine Protonierung der tertiären alkoholischen Gruppe. Es kann sich kein Carbokation bilden. Eine Epimerisierung findet nicht statt, oder
- ☐ eine Protonierung liegt vor. Durch Wasserabspaltung wird in Analogie zu Schema 17 ein Carbokation gebildet, welches allerdings nicht von planarer Gestalt ist. Durch Solvation können Carbokationen ihre chirale Form für längere Zeit aufrecht erhalten.

Weiterhin können sterische Gründe die Ursache für ein nichtplanares Kation sein [92]. Der Angriff erfolgt dann bevorzugt von einer Seite. Dies führt zur Regeneration des Ausgangszustandes des stereogenen Zentrums.

Das Fazit der experimentellen Untersuchungen ist, dass enantiomere Benzilate in einem pH-Bereich von 2,02 bis 9,03 stereochemisch stabil sind. Nur im stark saurem Milieu können Racemisierungs-/Epimerisierungsprozesse ablaufen. Dieses muss bei der Darstellung und Aufarbeitung von enantiomeren Benzilaten berücksichtigt werden, um Fehlinterpretationen der untersuchten Darstellungsmethoden zu vermeiden. Unter den Versuchsbedingungen der Radioligand-Bindungsstudien sollten ebenfalls keine Racemisierungsprozesse der enantiomeren Benzilate auftreten.

3.4 Radioligand-Bindungsstudien an Muscarinrezeptorsubtypen

Es ist bekannt, dass basische Benzilsäureester, speziell N-Methyl-4-piperidyl benzilate, eine ausgeprägte anticholinerge Wirkung besitzen. Trotz zunehmender Aktivitätsunterschiede von enantiomeren N-Methyl-4-piperidyl benzilaten wurden Affinität und Subtypenselektivität zu den Muscarinrezeptoren bislang nur für die racemischen Benzilate untersucht. In Radioligand-Bindungsstudien sollte daher der Einfluss der absoluten Konfiguration des asymmetrischen C-Atoms im Benzilsäuremolekül auf Affinität und Subtypenselektivität zu den Muscarinrezeptoren von acht Enantiomeren (1, 2, 7, 8, 9, 10, 17, 18) untersucht werden.

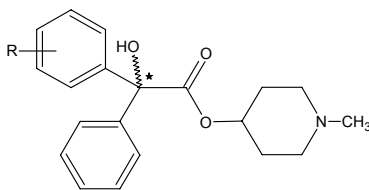
3.4.1 Untersuchungen

Die Bestimmung der Affinitäten der Verbindungen erfolgte in Konkurrenzexperimenten an humanen Muscarinrezeptorsubtypen M₁, M₂ und M₃. Verwendet wurden CHO-Zellen, die die jeweiligen humanen Subtypen exprimieren. Als Radioligand dient [³H]-N-Methylscopolamin bromid ([³H]-NMS). Die Testsubstanzen wurden in sieben aufsteigenden Konzentrationen im Abstand von einer halben log-Stufe entsprechend ihrer Affinität eingesetzt. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 10 µM Atropin bestimmt. Die gebundene Radioaktivität wurde mittels Flüssig-Scintillationszähler (Packard 1500 Tricarb liquid scintillation analyser) gemessen. Unter Verwendung der CHEN- und PRUSOFF-Gleichung [93] wurden die K_i-Werte der untersuchten Verbindungen berechnet. Die HILL-Koeffizienten n_H sämtlicher Konkurrenzkurven lagen bei 1. Somit kann eine

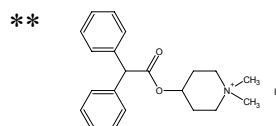
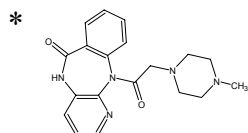
- *positive Kooperation* (n_H > 1), d. h. die Bindung eines Moleküls erleichtert die Bindung weiterer Moleküle, und
 - *negative Kooperation* (n_H < 1), d. h. die Bindung eines Moleküls erschwert die Bindung weiterer Moleküle,
- ausgeschlossen werden [94].

Die K_D-Werte für [³H]-NMS betrugen 0,27 nM (M₁), 0,46 nM (M₂) und 0,27 nM (M₃). Die pK_i-Werte (-log K_i) und Standardabweichungen der untersuchten Verbindungen sind in Tab. 23 zusammengefasst.

Tab. 23: pKi-Werte an den Muscarinrezeptorsubtypen



Substitution R (Verbindungs-Nr.)	M ₁	M ₂	M ₃	M ₁ /M ₂	M ₁ /M ₃	M ₃ /M ₂
(<i>R</i>) 4- <i>tert</i> -C ₄ H ₉ - (1)	7,52 ± 0,05	6,69 ± 0,09	7,52 ± 0,06	6,8	1	6,8
(<i>S</i>) 4- <i>tert</i> -C ₄ H ₉ - (2)	8,29 ± 0,04	7,48 ± 0,07	7,84 ± 0,05	6,5	2,8	2,3
(<i>R</i>) 4-(CH ₃) ₂ N- (7)	7,34 ± 0,08	6,73 ± 0,03	7,08 ± 0,09	4,1	1,8	2,2
(<i>S</i>) 4-(CH ₃) ₂ N- (8)	8,98 ± 0,10	7,28 ± 0,07	7,46 ± 0,02	50,1	33,1	1,5
(<i>R</i>) 4-F ₃ CO- (9)	7,39 ± 0,10	6,84 ± 0,08	7,08 ± 0,09	3,5	2,0	1,7
(<i>S</i>) 4-F ₃ CO- (10)	8,91 ± 0,06	8,61 ± 0,04	8,40 ± 0,06	2,0	3,2	0,6
(<i>R</i>) 4-CH ₃ SO ₂ - (17)	6,58 ± 0,16	5,8 ± 0,04	6,39 ± 0,02	6,0	1,5	3,9
(<i>S</i>) 4-CH ₃ SO ₂ - (18)	8,37 ± 0,08	7,15 ± 0,17	7,77 ± 0,04	16,6	4,0	4,2
Vergleichssubstanzen						
Pirenzepin* (M ₁ -selektiv)	8,1	6,3	6,7	63	25	2,5
4-DAMP** (M ₃ -selektiv)	8,8	8,1	9,1	5,0	0,5	10



Aus Tab. 23 und der graphischen Darstellung der pKi-Werte (Diagramm 3) der *R*- und *S*-Enantiomere lässt sich entnehmen, dass die *S*-konfigurierten N-Methyl-4-piperidyl benzilate im Vergleich zu den *R*-Enantiomeren höhere Affinitäten an den muscarinergen Rezeptoren (M₁, M₂, M₃) besitzen. Generell gilt eine Reihenfolge der Affinitäten für *R*- und *S*-Enantiomere an den muscarinergen Rezeptorsubtypen: pKi (M₁) > pKi (M₃) > pKi (M₂). Eine Ausnahme bildet hierbei das (*S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluor-methoxybenzilat (**10**) mit pKi (M₁) > pKi (M₂) > pKi (M₃).

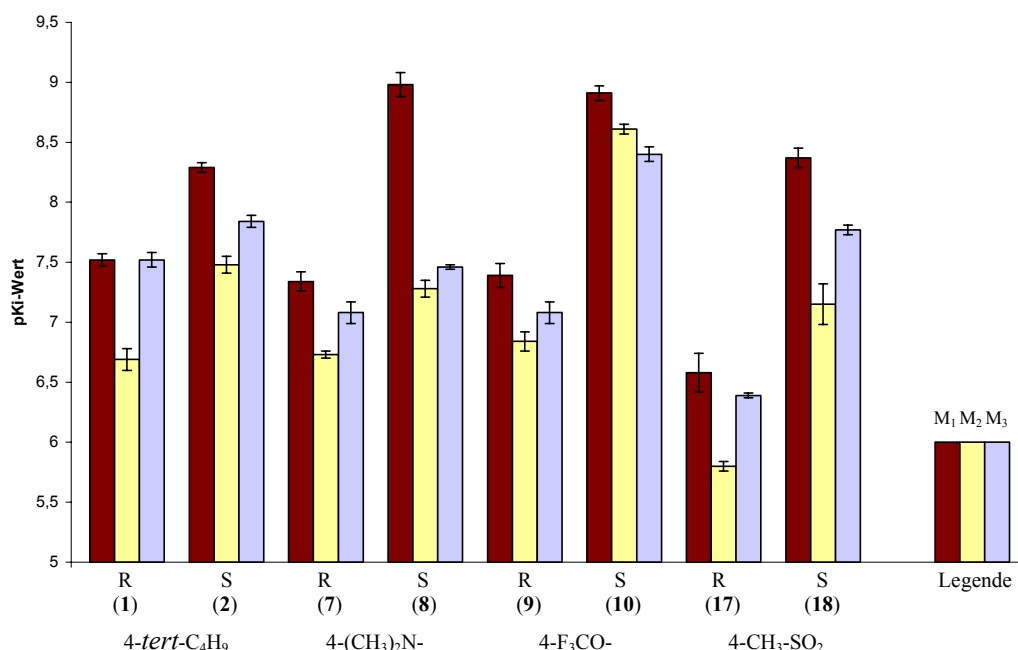


Diagramm 3: pKi-Werte der *R*- und *S*-Enantiomere an den muscarinergen Rezeptor-subtypen

Um präzise Aussagen über den Einfluss der absoluten Konfiguration der N-Methyl-4-piperidiyl benzilate auf Affinität und Selektivität an den muscarinergen Rezeptoren machen zu können, wurden

- die M₁/M₂-, M₁/M₃-, M₃/M₂-Verhältnisse jeder enantiomeren Verbindung bestimmt (Tab. 23) und
- die M₁/M₂-, M₁/M₃-, M₃/M₂-Verhältnisse der *S*- und *R*- Enantiomere einer Verbindung miteinander verglichen (Diagramm 4 und 5).

Im Folgenden wird der Begriff Selektivität, bezogen auf einen Rezeptorsubtyp, nur verwendet, wenn der pKi-Wert um eine pK-Einheit ($pK > 1$) verschieden ist, d. h. eine mindestens 10fach höhere Affinität vorliegt. Eine Präferenz zu einem Rezeptorsubtyp ist vorhanden, wenn die pKi-Differenz < 1 ist.

Die Affinitätsverhältnisse von M₁/M₂ der untersuchten Verbindungen liegen zwischen Werten von 2 bis 50. Eine Korrelation der Affinitätsverhältnisse M₁/M₂ zur absoluten Konfiguration war nicht festzustellen und wurde deshalb grafisch nicht veranschaulicht. Insbesondere ist das (*S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-dimethylaminobenzilat (**8**) mit 50facher M₁/M₂-Selektivität hervorzuheben. Daneben besitzt dieses Enantiomer eine 33fach höhere Affinität zum M₁-Rezeptor als zum M₃-Rezeptor. Somit ist **8** eine M₁-selektive Verbindung.

Ein Vergleich der *R*- und *S*-Enantiomere hinsichtlich ihrer M_3/M_1 - und M_3/M_2 -Affinitätsverhältnisse zeigt, dass sich trotz immer vorhandener M_1 -Präferenz oder M_1 -Selektivität die Affinität zum M_3 -Rezeptor durch die jeweiligen *R*-konfigurierten Benzilate gefördert wird bzw. in Umkehr die *S*-Enantiomere die M_1 - und M_2 -Affinität gegenüber M_3 protegieren. In Diagramm 4 ist das M_3/M_1 -Verhältnis graphisch veranschaulicht. Da die M_1 -Affinitäten generell größer sind als die M_3 -Affinitäten, finden wir Werte < 1 vor. Je größer die Zahlenwerte sind, desto geringer ist der Affinitätsunterschied von M_3 und M_1 , d. h. die Rezeptoraffinität verschiebt sich zu Gunsten des M_3 -Rezeptors. Ein Maximum wird für das *R*-Enantiomer der *tert*-Butylverbindung (1) mit 1 erreicht, welches gleiche pK_i -Werte für M_1 und M_3

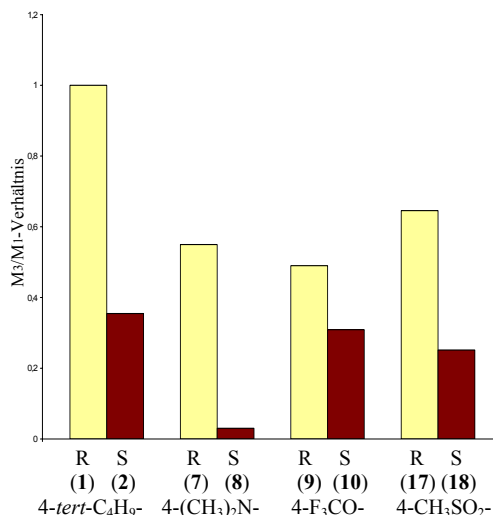


Diagramm 4: M_3/M_1 -Affinitätsverhältnisse enantiomerer Benzilate

aufweist. Weiterhin werden die M_1 -selektiven Eigenschaften der (*S*)-Dimethylaminoverbindung (8) deutlich, was sich in einem sehr kleinen Wert widerspiegelt. Interessant ist, dass die Affinitätsunterschiede M_3/M_1 für alle *R*-Enantiomere geringer (größere Zahlenwerte) als für die *S*-Enantiomere (kleinere Zahlenwerte) sind (Diagramm 4). Offensichtlich kann mit *R*-konfigurierten Benzilaten die Affinität zu Gunsten des M_3 -Rezeptors verschoben werden. Neben den Verbindungen 1/2 ist dieser Effekt sehr deutlich bei 4-Dimethylaminobenzilat 7/8 ausgeprägt. Das *S*-Enantiomer der 4-Dimethylaminoverbindung (8) ist durch bemerkenswerte M_1 -Selektivität gekennzeichnet (M_1/M_3 33fach). Durch *R*-Konfiguration kommt es hingegen zu einem drastischen Rückgang der M_1 -Affinität (Verlust der M_1 -Selektivität). Trotz des gleichzeitigen leichten Rückgangs der M_3 -Affinität verschiebt sich die Rezeptoraffinität zu Gunsten des M_3 -Rezeptors. Dieses neue Erkenntnis kann für die Entwicklung M_3 -selektiver Antagonisten von Bedeutung sein.

Ähnliche Tendenzen konnten für die M_3/M_2 -Präferenz und -Selektivität registriert werden.

Da sämtliche M_3 -Affinitäten größer sind als die M_2 -Affinitäten, finden wir in Diagramm 5 Zahlenwerte > 1 . Die M_3/M_2 -Verhältnisse liegen zwischen 1 bis 7. Auch hier kann eine Zunahme der M_3 -Affinität in Abhängigkeit von der *R*-Konfiguration beobachtet werden. Einzige Ausnahme ist N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethoxybenzilat (**9/10**). Die größte Präferenz zum M_3 -Rezeptor zeigt das (*R*)-N-Methyl-4-piperidyl *tert*-butylbenzilat (**1**) mit einer 7fach höheren Affinität gegenüber dem

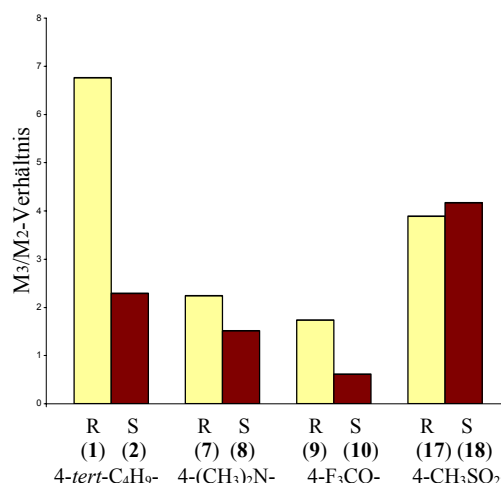


Diagramm 5: M_3/M_2 -Affinitätsverhältnisse enantiomerer Benzilate

M_2 -Rezeptor. Das M_3/M_2 -Verhältnis von **1** (7fach) ist mit der M_3 -selektiven Verbindung 4-DAMP (10fach) vergleichbar (Tab. 23). Das M_3/M_1 -Verhältnis für 4-DAMP beträgt 2. Das (*R*)-N-Methyl-4-piperidyl *tert*-butylbenzilat (**1**) weist dagegen mit seinen identischen pK_i -Werten für M_1 und M_3 nur ein M_3/M_1 -Verhältnis von 1 auf.

3.4.2 Diskussion

Neue und interessante Erkenntnisse zur Affinität und Subtypenselektivität an muscarinergen Rezeptoren in Abhängigkeit von stereochemischen Eigenschaften der N-Methyl-4-piperidyl benzilate konnten mit Radioligand-Bindungsstudien gewonnen werden. Eine Modifikation der Affinität und Subtypenselektivität ist in Abhängigkeit von der Konfiguration der N-Methyl-4-piperidyl benzilate möglich.

Rezeptoraffinität in Abhängigkeit von der Benzilsäurekonfiguration. In Konkurrenzexperimenten an humanen Muscarinrezeptorsubtypen M_1 , M_2 und M_3 wurde nachgewiesen, dass die *S*-konfigurierten N-Methyl-4-piperidyl benzilate (Eutomer) generell höhere Affinitäten an muscarinergen Rezeptoren (M_1 , M_2 und M_3) als die *R*-Enantiomere (Distomer) besitzen.

Die Reihenfolge der Affinitäten an den muscarinergen Rezeptorsubtypen ist für *R*- und *S*-Enantiomere gleichermaßen: $pK_i (M_1) > pK_i (M_3) > pK_i (M_2)$. Eine Ausnahme bildet (*S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethoxybenzilat (**10**).

Bereits in zurückliegenden Arbeiten wurden die pKi-Werte der Racemate von der 4-Trifluormethyl- (**77**) ($pK_i (M_1) = 9,06$) und 3-Methoxyverbindung (**79**) ($pK_i (M_1) = 8,73$) durch Radioligand-Bindungstudien an Muscarinrezeptoren bestimmt [5] (Abb. 26). Da aufgrund der neuen Erkenntnisse zu den enantiomeren Affinitätsunterschieden von der Annahme ausgegangen werden kann, dass das reine *S*-Enantiomer eine höhere Affinität als das Racemat besitzt, sind die *S*-Enantiomere dieser Verbindungen von großem Interesse. Der $pK_i (M_1)$ -Wert des *S*-Enantiomers der 4-Trifluormethylverbindung (**12**) würde vermutlich weit über 9,0 liegen. Damit könnte

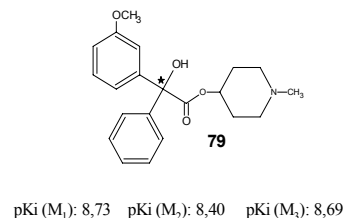
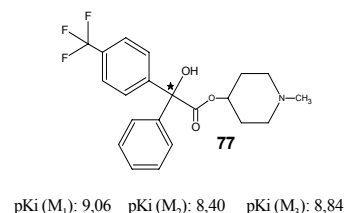


Abb. 26: pK_i -Werte der Racemate **77** und **79**

12 der unsubstituierten Benzilsäure ($pK_i (M_1): 9,52$) in der Affinität gleichen oder sich sogar durch eine höhere Affinität auszeichnen. Die (*S*)-3-Methoxyverbindung (**16**) ist von besonderer Bedeutung, da hier das Racemat anticholinerge und indirekt dopaminerge Eigenschaften vereinigt. Diese Verbindung könnte eine neue Klasse von Antiparkinsonika darstellen.

Subtypenselektivität in Abhängigkeit von der Benzilsäurekonfiguration. Die Feststellung, dass *R*-konfigurierte Benzilsäure in basischen Benzilaten neben einer immer vorhandenen M_1 -Präferenz die Affinität zum M_3 -Rezeptor begünstigt bzw. in Umkehr das *S*-Enantiomer vor allem die M_1 -Affinität begünstigt, ist eine neue Erkenntnis. Dieses Ergebnis bestätigt nicht die Beobachtungen von KIESEWETTER, der allerdings Stereoisomere von 3-Chinuclidinyl benzilaten untersuchte [6]. KIESEWETTER stellte fest, dass *R*-konfigurierte Benzilsäure die M_1 -Selektivität fördert, während das *S*-Enantiomer möglicherweise die M_2 -Selektivität begünstigt. Für kernsubstituierte (*R*)-Chinuclidinyl (*R*)-benzilate wurde eine 9 bis 12fache M_1 -Selektivität über M_2 von KIESEWETTER gefunden. Dagegen konnte für substituierte (*R*)-Chinuclidinyl (*S*)-benzilate keine Subtypenselektivität mehr festgestellt werden. Eine Ausnahme bildet hierbei das *R,S*-Stereoisomer des Fluormethylsubstituierten Benzilates mit einer 6,8fachen M_2/M_1 -Präferenz. Das ist für KIESEWETTER ein Hinweis, dass *S*-konfigurierte Benzilsäuren möglicherweise eine M_2 -Selektivität fördern. Diese unterschiedlichen Beobachtungen lassen sich nur dadurch erklären, dass die basische Alkoholkomponente im Benzilatmolekül einen Einfluss auf die

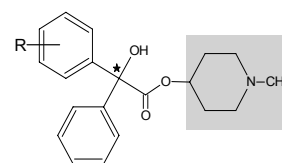
Subtypenselektivität besitzen muss (s. u.).

Im Hinblick auf einen gezielten therapeutischen Einsatz kann in Abhängigkeit vom stereogenen Zentrum eine Modifikation der muscarinergen Subtypenselektivität erzielt und somit die Wirkqualität moduliert werden:

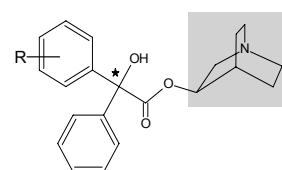
- Das *S*-Enantiomer von N-Methyl-4-piperidyl 4-dimethylaminobenzilat (**8**) besitzt eine ausgeprägte M_1 -Selektivität und ist vergleichbar mit dem M_1 -selektiven und als Ulkustherapeutikum verwendeten Pirenzepin (M_1/M_2 63fach, M_1/M_3 nur 25fach).
- Dagegen stellt das *R*-Enantiomer von N-Methyl-4-piperidyl 4-*tert*-butylbenzilat (**1**) innerhalb der untersuchten Verbindungen mit der größten Tendenz zur M_3 -Selektivität eine potenzielle Verbindung für die Behandlung von Harninkontinenz dar.

Einfluss der basischen Alkoholkomponente auf die Subtypenselektivität. Durch einen Vergleich der Affinitäten an den Rezeptorsubtypen von N-Methyl-4-piperidyl benzilaten und 3-Chinuclidinyl benzilaten können Aussagen über den Einfluss des basischen Alkoholrestes im Benzilsäureester gemacht werden. KIESEWETTER et al. untersuchten die isolierten Stereoisomere von parasubstituierten Benzilaten des 3-Chinuclidinols [6]. Die Stereoisomere zeigten neben Affinitätsunterschieden auch Subtypenselektivität. Die basische Alkoholkomponente, die einen essentiellen Bestandteil für die Wechselwirkung mit dem Rezeptor darstellt, ist für die Affinität von großer Bedeutung. Hier erwiesen sich die Verbindungen mit (*R*)-Chinuclidinol als diejenigen mit höherer Affinität und einem Beitrag zur M_1 -Selektivität. Keine der untersuchten Verbindungen, die (*S*)-Chinuclidinol enthielten, konnte eine Subtypenselektivität aufweisen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Radioligand-Bindungsstudien lassen nun folgende Schlussfolgerung hinsichtlich der Subtypenselektivität zu. N-Methyl-4-piperidyl benzilate wie auch *R*-Chinuclidinyl benzilate sind durch eine ausgeprägte M_1 -Präferenz/-Selektivität gegenüber M_2 und

M_3 gekennzeichnet. Die Unterschiede zwischen diesen basischen Benzilsäureestern werden erst bei Betrachtung der M_2 - und M_3 -Affinitäten sichtbar. Bei allen untersuchten



N-Methyl-4-piperidyl benzoat
 $pK_i (M_1) \geq pK_i (M_3) > pK_i (M_2)$



R-Chinuclidinyl benzoat
 $pK_i (M_1) \geq pK_i (M_2) > pK_i (M_3)$

Abb. 27: M_2 - und M_3 -Präferenz basischer Benzilsäureester

N-Methyl-4-piperidyl benzilaten lagen die Affinitäten für M_3 -Rezeptoren über denen der M_2 -Rezeptoren. KIESEWETTERS *R*-Chinuclidinyl benzilate besitzen ausnahmslos eine M_2 -Selektivität gegenüber M_3 . Somit fördert N-Methyl-4-piperidol als Alkoholkomponente im Benzilat neben der M_1 -Affinität hauptsächlich die M_3 -Rezeptoraffinität. Dagegen ist *R*-Chinuclidinol neben einer M_1 -Affinität für eine ausgeprägte M_2 -Rezeptoraffinität verantwortlich.

Der *Einfluss der Substituenten* des aromatischen Systems auf die Rezeptoraffinität wird im folgenden Kapitel anhand der Rezeptormodelle diskutiert.

3.5 Molecular Modelling

3.5.1 Einleitung

Um die unterschiedliche Affinität der *S*- und *R*-enantiomeren Benzilate sowie die vorhandene Subtypenselektivität an Muscarinrezeptoren auf molekularer Ebene qualitativ und quantitativ zu erklären, soll mit Molecular Modelling Methoden [95, 96] anhand der experimentellen Bindungsdaten (Kap. 3.4) ein Rezeptormodell erarbeitet werden. Muscarinrezeptoren gehören zur Familie der G-proteingekoppelten Rezeptoren. Sie sind charakterisiert durch sieben hydrophobe transmembranäre Segmente, welche durch extra- und intrazelluläre Schleifen (Loops) miteinander verbunden sind (Abb. 28) [97].

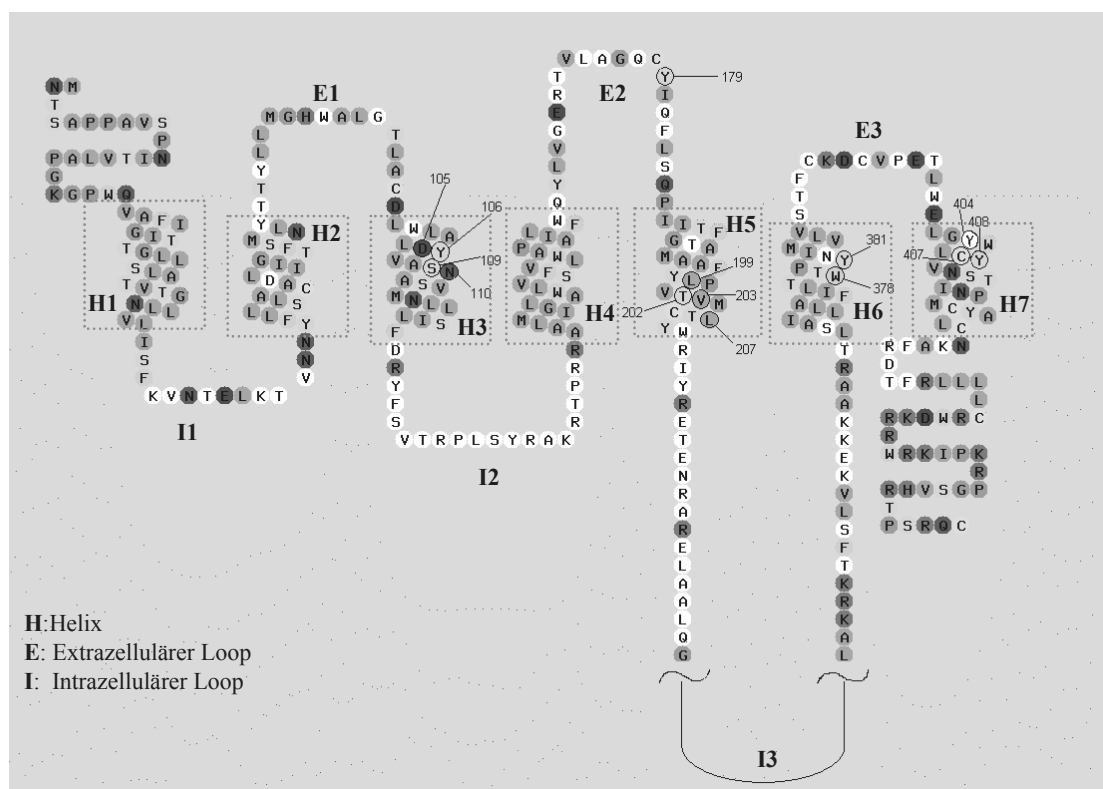


Abb. 28: M₁-Rezeptor mit bindungsrelevanten Aminosäuren (modifiziert nach [98])

Die einzige dreidimensionale Struktur eines sieben transmembranären G-proteingekoppelten Rezeptors wurde bisher nur für Rinder-Rhodopsin mit einer Auflösung von 2,8 Å aufgeklärt [99]. Basierend auf der dreidimensionalen Struktur des Rhodopsins können Muscarinrezeptoren modelliert werden. Aufgrund einer sehr großen Sequenzidentität innerhalb der Muscarinrezeptorsubtypen (> 70 %), ist die Entwicklung

von M_1 -, M_2 - oder M_3 -selektiven Arzneistoffen problematisch und stellt eine Herausforderung dar. Auf der Suche nach der richtigen Bindungsregion kann das Wissen der Subtypenselektivität von Agonisten und Antagonisten zur richtigen Bindungsstelle führen. Somit sollten Aminosäuren des Rezeptorproteins, die innerhalb der Muscarinrezeptoren nicht homolog (nicht konserviert) sind, an der Bildung des Ligand-Rezeptor-Komplexes direkt oder indirekt beteiligt sein. Dadurch erklären sich unterschiedliche Affinitäten des gleichen Liganden an den Rezeptorsubtypen (M_1 , M_2 , M_3). Ist die wahrscheinliche Bindungsstelle identifiziert und gelingt es dadurch, wesentliche Aspekte der Struktur-Wirkungsbeziehungen der Liganden zu erklären, so kann versucht werden, auf dieser Basis neue selektive Liganden zu entwickeln.

Bindungsmechanismus. Die sieben transmembranären Segmente (Helix 1 bis 7) sind von der extrazellulären Seite betrachtet elliptisch angeordnet, wobei Helix 3 eine fast zentrale Lage einnimmt. Die extrazelluläre Seite wird durch flexible Loopbereiche (extrazellulärer Loop (E) 2 und 3) begrenzt (Abb. 29). Nur wenig ist bisher über die Bedeutung der extrazellulären Loops bekannt. Vermutlich besitzt der E2 eine deckelartige Funktion [100], wodurch unter anderem das Eintreten des Liganden in die Bindungstasche moduliert wird.

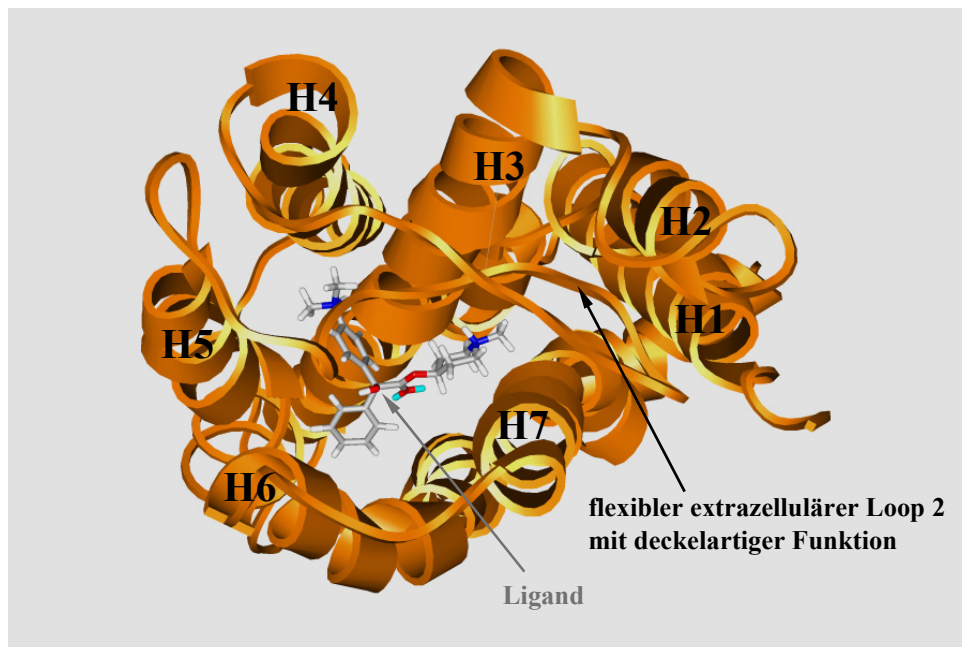


Abb. 29: Extrazelluläre Sicht auf M_1 -Rezeptor mit Ligand (H: Helix)

Im ersten Schritt könnte es zu einer Wechselwirkung des Liganden mit dem Loopbereich kommen. Durch eine Konformationsänderung des extrazellulären Loopbereiches kann der Ligand dann im zweiten Schritt in den hydrophoben transmembranären Bereich des Rezeptors eindringen und zur eigentlichen Bindungsstelle gelangen. Ein Agonist überführt den Rezeptor aus der inaktiven Form in den aktiven Zustand, wodurch sich die Konformationen der intrazellulären Loops ändert, an welche die G-Proteine gekoppelt sind. Hingegen stabilisiert ein Antagonist die inaktive Konformation des Rezeptors. Interessante Ansätze, weshalb eine Substanz als Agonist oder Antagonist wirkt und welche Vorgänge bei der Rezeptoraktivierung ablaufen, werden unter anderem von SCHWARTZ [101, 102] diskutiert. Möglicherweise kommt dem Trp378 (M₁, Helix 6) und seiner eingenommenen Konformation eine besondere Bedeutung beim Initialschritt der Rezeptoraktivierung zu. Das Trp378 könnte damit eine wichtige Funktion bei der Liganderkennung (Agonist oder Antagonist) übernehmen.

Bindungsstelle für Agonisten und Antagonisten. Das Bindungsareal muscarinerger Agonisten und Antagonisten ist Gegenstand einer Vielzahl von Forschungsarbeiten [100, 103, 104]. Die Bedeutung einzelner Aminosäuren im Rezeptorprotein für die Ligandbindung kann durch Punktmutationen und deren Auswirkung auf die Bildung des Ligand-Rezeptor-Komplexes bewertet werden. Die Bindungstasche im M₁-Rezeptor für den Antagonisten N-Methylscopolamin (NMS) wird insbesondere durch die Aminosäuren Asp105, Tyr106, Tyr381, Asn382, Tyr404, Cys407 und Tyr408 begrenzt. Der Phenylring von NMS wird nahe der Aminosäure Asn110 vermutet [100]. Durch Mutation von Asn382 und Tyr408 wurde die Affinität um das 1000-3000fache gesenkt. Eine 100fache Affinitätserniedrigung konnte für die Aminosäuren Asp105, Tyr106, Trp157 festgestellt werden. Etwas geringere Auswirkungen (10-20fache Reduzierung) zeigten unter anderem Asn110, Tyr404 [104]. Das als Agonist wirkende Acetylcholin bindet in ähnlicher Weise wie NMS. Essentiell für die Affinität des Acetylcholins ist die Ausbildung einer ionischen Bindung von der Carboxylatgruppe des Asp105 zur Ammoniumgruppe des Acetylcholins. Die Formierung einer derartigen Salzbrücke wird ebenso für Antagonisten diskutiert [103].

3.5.2 Methoden

3.5.2.1 Modelling der Rezeptoren

Basierend auf der Röntgenkristallstruktur des Rinder-Rhodopsins (PDB 1F88) wurde mit MOE (Molecular operating environment) [105] ein Alignment für die Muscarinrezeptoren M₁, M₂ und M₃ durchgeführt. Zwischen den Sequenzen des Rhodopsinproteins und der Muscarinrezeptoren besteht eine Sequenzidentität von ca. 25 %. Generell lässt sich sagen, dass die Homologie in den transmembranären Segmenten, welche die Bindungsstelle enthalten, sehr viel größer ist als in den Loopbereichen. Eine Aminosäuresequenz von 24 Aminosäuren vom N-Terminus und eine weitere Sequenz von 138 Aminosäuren vom dritten intrazellulären Loop wurden herausgeschnitten. Nachweislich besteht eine unveränderte Ligandbindungsaktivität [106]. Anschließend wurden für die Muscarinrezeptoren (M₁, M₂, M₃) mit MOE jeweils zehn verschiedene Modelle automatisch generiert. Für weitere Optimierungen wurden die Modelle mit den wenigsten Aminosäuren in unerlaubten Bereichen eines RAMACHANDRAN-Plots (Rückgrattorsionswinkel Phi und Psi) verwendet. Zur Verfeinerung und Optimierung der mit MOE erhaltenen Strukturmodelle wurden zunächst die Seitenketten optimiert, d. h. die Rückgratatom der Aminosäuren fixiert und der Rezeptor durch ca. 5000 Minimierungsschritte bis zu einem Energie cut-off von 0,01 kcal/mol auf der Grundlage des Tripos-Kraftfeldes [107] mit Gasteiger-Partialladungen [108] und Distanz abhängiger Dielektrizitätskonstante energieminiert, welches im Molecular Modelling Programmpaket SYBYL [109] implementiert ist. Danach wurde die gesamte Struktur vollständig optimiert und gegebenenfalls die Konformationen einzelner Aminosäurereste, welche in nicht erlaubten Bereichen eines RAMACHANDRAN-Plots lagen, in den Loopbereichen manuell verändert. Schließlich konnten Strukturmodelle für alle Rezeptorsubtypen erhalten werden, welche im RAMACHANDRAN-Plot mit Ausnahme von Glycin keine Aminosäure in unerlaubten Regionen aufwiesen.

Die Qualität der Rezeptormodelle wurde weiterhin mit PROCHECK [110] auf Übereinstimmung von Bindungslängen, Bindungswinkel, Torsionswinkel, *cis*-Peptidbindung (nur für Prolin erlaubt) und Chiralität der Aminosäuren überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Alle diese Werte liegen für die Modelle in erlaubten Bereichen.

3.5.2.2 Dockingstudien

Unter Verwendung von GOLD (Genetic Optimized Ligand Docking) [111] wurden für acht enantiomere Benzilsäureester und einige achirale Strukturen jeweils 20 Dockinganordnungen für die modellierten Muscarinrezeptoren M₁, M₂ und M₃ berechnet. Als Bindungsregion wurde ein Radius von 15 Å, ausgehend von der Carboxylatgruppe des für die Bindungsstelle essentiellen Aspartats (105 (M₁), 103 (M₂), 148 (M₃)), verwendet. Die Liganden wurden in protonierter Form (protoniertes N-Atom im Piperidylring) für die Berechnungen eingesetzt. Die Ausgangskonformation des Liganden ist von untergeordneter Bedeutung, da mit GOLD systematisch nach der pharmakophoren Ligandkonformation gesucht wird. Für jede durch GOLD gefundene Dockinganordnung wurde mit SCORE (bezieht Solvatationseffekte und teilweise Entropieeffekte mit ein) [112] der pK_d-Wert ermittelt (welcher der experimentellen Bindungsaffinität (pK_i) nahe kommen sollte bzw. theoretisch entspricht). Die Bindungsanordnung eines Liganden mit dem höchsten Fitness-Wert von GOLD und dem besten errechneten pK_d-Wert durch SCORE wurde energetisch optimiert.

3.5.2.3 Energieoptimierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes

Jeder Rezeptor-Ligand-Komplex, der aus den Dockingstudien hervorging, wurde energetisch optimiert. Diese Prozedur simuliert ansatzweise die strukturelle Anpassung zwischen Rezeptor und Ligand (induced fit), wie sie in der Natur anzutreffen ist. Dabei wurden die Rückgratatom des Rezeptorproteins fixiert und die Seitenkettenatome bis zu einem Energie cut-off von 0,01 kcal/mol mittels Tripos-Kraftfeld energieminiert.

3.5.3 Ergebnisse

3.5.3.1 Qualitative Auswertung

Charakteristisch für alle Dockinganordnungen der untersuchten Liganden und einheitlich für alle Rezeptorsubtypen (M_1 , M_2 , M_3) ist die Bindungstasche innerhalb der sieben Transmembranhelices (Abb. 30). Die Aminosäuren, die diese Bindungstasche bilden, sind in Tab. 24 aufgeführt. Fett hervorgehoben sind die Aminosäuren, die unmittelbar mit dem Liganden in Wechselwirkung treten und die innerhalb der Rezeptorsubtypen nicht konserviert vorliegen. Sie sind verantwortlich für die unterschiedliche Affinität eines Liganden zu den Rezeptorsubtypen (M_1 , M_2 , M_3).

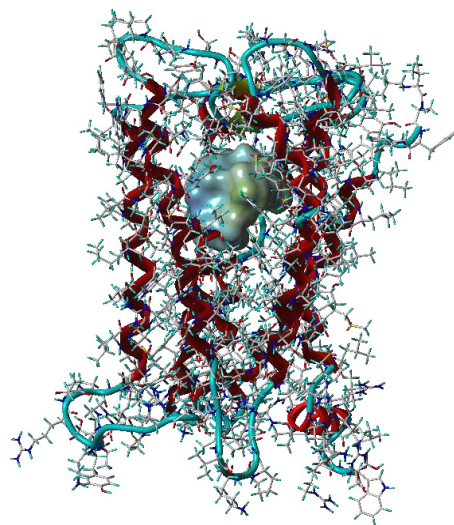


Abb. 30: Modellierter M_1 -Rezeptor mit dargestellter Bindungstasche

In der nachfolgenden Beschreibung der Bindungsstelle wird zur Vereinfachung immer die Nomenklatur des M_1 -Rezeptors verwendet, vorausgesetzt, es ist nichts anderes vermerkt. Die korrespondierenden Aminosäuren können Tab. 24 entnommen werden.

Tab. 24: Aminosäuren der Bindungstasche des M_1 -, M_2 - und M_3 -Rezeptors

M_1	M_2	M_3	Bereich*	Kommentare
Asp105	Asp103	Asp148	H3	Salzbrücke
Tyr106	Tyr104	Tyr149	H3	S-Seite
Ser109	Ser107	Ser152	H3	S-Seite
Asn110	Asn108	Asn153	H3	S-Seite
Tyr179	Tyr177	Phe222	E2	Etherbrücke
Leu199	Leu197	Met242	H5	unspezifisch
Thr202	Ile200	Thr245	H5	S-Seite
Val203	Ile201	Ile246	H5	S-Seite
Leu207	Leu205	Leu249	H5	S-Seite
Trp378	Trp400	Trp504	H6	R-Seite
Tyr381	Tyr403	Tyr507	H6	R-Seite
Tyr404	Tyr426	Tyr529	H7	Piperidylring
Cys407	Cys429	Cys533	H7	Piperidylring
Tyr408	Tyr430	Tyr534	H7	N-Methyl

* H: Helix, E: Extrazellulärer Loop

Beschreibung der Bindungstasche und Art der Wechselwirkung mit den Liganden.
 Folgende Wechselwirkungen sind für sämtliche Liganden an den Rezeptorsubtypen M₁, M₂ und M₃ identisch:

- Die Ausbildung einer Salzbrücke zwischen dem protonierten Stickstoffatom des Piperidylrings und Asp105,
- die Tyrosinseitenketten Tyr404 und Tyr408 stabilisieren die Anordnung des Piperidylrings in der Bindungstasche über hydrophobe Wechselwirkungen unter anderem zur N-Methylgruppe des Piperidylrings (Tyr408),
- zusätzlich wird die Carboxylatgruppe des Asp105 (essentiell für die Salzbrücke) und die Position des Tyr404 durch gegenseitige Wechselwirkung über eine Wasserstoffbrücke fixiert.

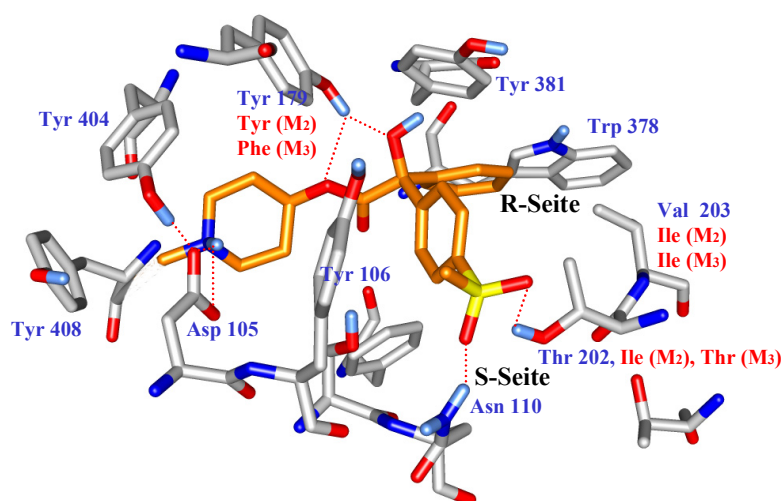


Abb. 31: Bindung von (*S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-methylsulfonylbenzilat an den M₁-Rezeptor. Rot markiert sind die Aminosäuren, die innerhalb der Rezeptorsubtypen (M₁, M₂ und M₃) nicht konserviert vorliegen. Die Wasserstoffbrücken sind durch punktierte Linien dargestellt.

Enantiomere Affinitätsunterschiede. Die höhere Affinität der *S*-Enantiomere im Vergleich zu den *R*-Enantiomeren lässt sich folgendermaßen erklären:

- Liegt ein *S*-konfiguriertes Enantiomer vor, kommt es zu einer bevorzugten Wechselwirkung der Substituenten mit dem konservierten Asn110 in der so genannten *S*-Seite. Hydrophil substituierte Derivate (Methylsulfonyl-, Trifluormethoxy- und

Dimethylamino-) können in der *S*-Seite Wasserstoffbrücken insbesondere mit Asn110 und Thr202 ausbilden (Abb. 31).

- Bei *R*-konfigurierten Benzilaten liegt der substituierte Ring in der so genannten *R*-Seite. Hier fehlen Möglichkeiten der Stabilisierung über Wasserstoffbrücken mit den Substituenten des *R*-Enantiomers. Die Konsequenz ist eine geringere Affinität der *R*-konfigurierten Benzilate (Abb. 32).

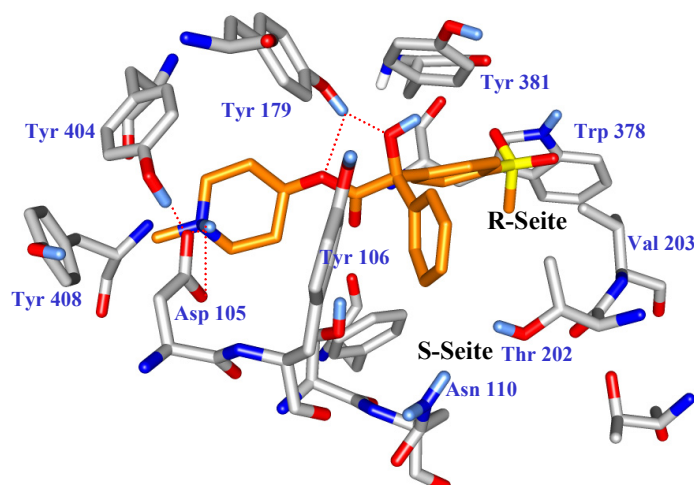


Abb. 32: Bindung von (*R*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-methylsulfonylbenzilat an den M₁-Rezeptor

Affinitätsunterschiede an den Rezeptorsubtypen. Unterschiedliche Affinitäten an den Rezeptorsubtypen ($pK_i (M_1) > pK_i (M_3) > pK_i (M_2)$) sind in den Auswirkungen der nicht konservierten Aminosäuren (Tab. 24 und Abb. 31) auf die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung zu suchen:

- Affinitätsunterschied $pK_i (M_1) > pK_i (M_3)$: Einen geringen Beitrag zum Affinitätsrückgang an M₃ leistet vermutlich der Austausch von Val203 (M₁) durch Ile246 (M₃). Dagegen macht sich die Substitution des Tyr179 (M₁) gegen Phe222 (M₃) etwas stärker bemerkbar. Hierdurch gehen Wasserstoffbrücken der OH-Gruppe des Tyrosinrestes zum Ethersauerstoffatom und der Hydroxylgruppe verloren. Da sich alternativ eine schwache intramolekulare Wasserstoffbrücke zwischen Hydroxylgruppe und Esterbrückensauerstoffatom ausbilden kann, wirkt sich die fehlende H-Brücke zum Rezeptor gering aus. Dieser nivellierende Effekt ist eine Erklärung dafür, dass obwohl

M₂ über eine derartige Wasserstoffbrücke verfügt, die Affinität von M₂ nicht über der von M₃ liegt.

- Affinitätsunterschied pK_i (M₃) > pK_i (M₂): Eine sogar geringere Affinität der Liganden am M₂-Rezeptor wird dadurch erklärt, dass sich bei M₃ analog zu M₁ ein Threoninrest in der *S*-Seite befindet, der hydrophile Wechselwirkungen mit den Substituenten eingehen kann. Am M₂-Rezeptor ist das Thr245 (M₃) durch eine relativ große hydrophobe Isoleucin-Seitenkette (Ile200 (M₂)) in der *S*-Seite substituiert. Die hydrophilen Wechselwirkungen gehen verloren. Zudem wird die Bindungstasche insgesamt schmaler. Dadurch verringert sich nicht nur die Affinität der *S*-Enantiomere am M₂-Rezeptor, sondern auch die der *R*-Enantiomere (schmalere Bindungstasche).

Substituenteneinflüsse. Die Ursachen für Unterschiede der Rezeptoraffinität in Abhängigkeit von den Substituenten am aromatischen System sind in deren physikalisch-chemischen Eigenschaften und sterischen Effekten zu suchen:

- Die Fähigkeit des Liganden, hydrophile Wechselwirkungen zum Rezeptor aufzubauen, wird durch das Rezeptormodell (M₁-Rezeptor) gut wiedergegeben. Hydrophile Substituenten in para-Stellung steigern die Affinität der *S*-Enantiomere. Die gleichbleibend hohen experimentellen pK_i-Werte für alle hydrophilen *S*-Derivate bestätigen diesen Sachverhalt. Die bestehende Affinitätsreihenfolge der hydrophilen Substituenten (Dimethylamino- > Trifluormethoxy- > Methylsulfonyl-) am M₁-Rezeptor, kann auf unterschiedliche Partialladungen der Substituenten und somit auf die variierenden elektrostatischen Wechselwirkungen zurückgeführt werden. Ferner werden diese Wechselwirkungen durch sterische Effekte der Substituenten modifiziert.
- Substituenten mit hydrophoben und raumfüllenden Eigenschaften wie *tert*-Butyl- zeigen gute, jedoch die geringste Affinität am M₁-Rezeptor. Zum einen können zusätzliche hydrophile Wechselwirkungen (Wasserstoffbrücken in der *S*-Bindungsseite) nicht aufgebaut werden. Zum anderen erschwert der voluminöse Substituent weitere Wechselwirkungen in der engen Bindungstasche der *S*-Seite. Dass auch das *R*-Enantiomer eine geringere Affinität als das *S*-Isomer besitzt, hängt mit der sehr engen *R*-Bindungstasche zusammen, welche insbesondere von Trp378 und Tyr381 begrenzt wird.

- Unsubstituierte Benzilate: Das achirale unsubstituierte N-Methyl-4-piperidyl benzilat weist die höchsten experimentellen Affinitäten auf. Vermutlich werden jegliche sterischen Hinderungen durch Substituenten in den raumbegrenzten Bindungstaschen der *S*- und *R*-Seite vermieden. In diesem Fall bildet sich dann eine optimale Wasserstoffbrücke zwischen Asn110 und Thr202 aus. Diese beiden Aminosäuren realisieren ansonsten die Wechselwirkungen mit den Substituenten.

Pharmakophore Konformation des Liganden. Durch intramolekulare Wasserstoffbrücken zwischen Esterfunktion und Hydroxylgruppe können zwei Konformationen des Benzilatmoleküls stabilisiert werden (Kap. 3.2.5, Schema 15). Einerseits besteht die Möglichkeit der Wechselwirkung mit dem esteratischen Ethersauerstoff (*anti*-Konformation), andererseits mit dem Carbonyl-O-Atom (*syn*-Konformation). Aus den Dockingstudien mit GOLD ging das *anti*-Konformer als pharmakophore Konformation hervor. Interessanterweise zeigen experimentelle Untersuchungen Übereinstimmungen mit der berechneten *anti*-Konformation. Hierbei wurden rigide Analoga, bei denen eine kovalente Bindung die H-Brücke ersetzt (fixierte *anti*-Konformation), untersucht. Die Ergebnisse bestätigen, dass das *anti*-Konformer vom Muscarinrezeptor bevorzugt wird [113].

3.5.3.2 Quantitative Auswertung

Für die energetisch optimierten Rezeptor-Ligand-Komplexe wurden neben den berechneten pK_d-Werten (SCORE-Werte) die Wechselwirkungsenergien (WWE) bestimmt. Die SCORE-Werte ließen nur ansatzweise eine Korrelation zu den experimentellen Daten zu. So wurden beispielsweise die hydrophoben Wechselwirkungen der *tert*-Butyl-Verbindung durch SCORE wesentlich höher bewertet als die hydrophilen Wechselwirkungen der Dimethylamino-Verbindung. Nachfolgende Untersuchungen konzentrierten sich daher auf die Wechselwirkungsenergien des Rezeptor-Ligand-Komplexes. Da alle untersuchten Strukturen ähnliche Entropiebeiträge (Zahl der rotierbaren Bindungen) und sehr ähnliche Solvatationsenergien aufweisen sollten, müsste eine Korrelation mit den berechneten Wechselwirkungsenergien bestehen. Entsprechend der Gibbs-Helmholtz-Gleichung ist eine lineare Abhängigkeit zu erwarten.

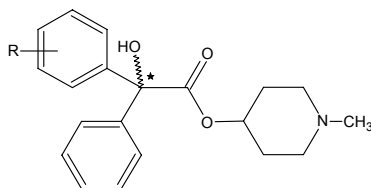
Um vergleichbare Wechselwirkungsenergien der Rezeptor-Ligand-Komplexe zu erhalten,

muss die Energie des Rezeptor-Ligand-Komplexes unter den absolut gleichen Voraussetzungen für jeden Liganden bestimmt werden. Die Wechselwirkungsenergie (WWE) wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{WWE} = E_{\text{RL}} - (E_{\text{R}} + E_{\text{L}}).$$

E_{RL} ist die Energie des Rezeptor-Ligand-Komplexes, E_{R} entspricht der Energie des isolierten Rezeptorproteins und E_{L} stellt die Energie des isolierten Liganden dar [95]. Die zur Berechnung der Wechselwirkungsenergie verwendeten Energien stammen von den optimierten Strukturen des Rezeptorproteins, des Liganden bzw. Rezeptor-Ligand-Komplexes. Die erhaltenen Energien E_{RL} , E_{R} und E_{L} und die daraus resultierenden Wechselwirkungsenergien sind der Tab. 25 zu entnehmen. Je negativer die WWE, desto stabiler ist der Rezeptor-Ligand-Komplex, was in einer höheren Affinität des Liganden resultiert.

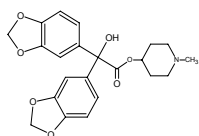
Tab. 25: Berechnete Wechselwirkungsenergien (WWE) der Rezeptor-Ligand-Komplexe



Substitution R	pKi*	E _{RL} [kcal/mol]	E _R [kcal/mol]	E _L [kcal/mol]	WWE [kcal/mol]	Rezeptor- subtyp
4-CH ₃ -SO ₂ -	<i>S</i> 8,37	-2214,5	-2160,5	22,1	-76,1	M ₁
	<i>R</i> 6,58	-2200,5	-2160,5	22,1	-62,1	M ₁
4-F ₃ CO-	<i>S</i> 8,91	-2220,4	-2160,5	23,9	-83,8	M ₁
	<i>R</i> 7,39	-2211	-2160,5	23,9	-74,4	M ₁
4- <i>tert</i> -C ₄ H ₉ -	<i>S</i> 8,29	-2221,7	-2160,5	23,9	-85,1	M ₁
	<i>R</i> 7,52	-2203,1	-2160,5	23,9	-66,5	M ₁
4-(CH ₃) ₂ N-	<i>S</i> 8,98	-2209,9	-2160,5	43,9	-93,3	M ₁
	<i>R</i> 7,34	-2181,2	-2160,5	43,9	-64,6	M ₁
H	- 9,94	-2230,8	-2160,5	22,6	-92,9	M ₁
Dioxolo-**	- 8,45	-2187,4	-2160,5	50,6	-77,5	M ₁
4,4'-bis(F ₃ CO-)	- 8,77	-2219,1	-2160,5	22,9	-81,5	M ₁
4-CH ₃ -SO ₂ -	<i>S</i> 7,15	-2212,6	-2166,4	22,1	-68,3	M ₂
	<i>R</i> 5,80	-2191,6	-2166,4	22,1	-47,3	M ₂
4-F ₃ CO-	<i>S</i> 8,61	-2226,8	-2166,4	23,9	-84,3	M ₂
	<i>R</i> 6,84	-2209,4	-2166,4	23,9	-66,9	M ₂
4- <i>tert</i> -C ₄ H ₉ -	<i>S</i> 7,48	-2219,2	-2166,4	23,9	-76,7	M ₂
	<i>R</i> 6,69	-2207,1	-2166,4	23,9	-64,6	M ₂
4-(CH ₃) ₂ N-	<i>S</i> 7,28	-2195,2	-2166,4	43,9	-72,7	M ₂
	<i>R</i> 6,73	-2188,6	-2166,4	43,9	-66,1	M ₂
Dioxolo-**	- 8,18	-2198,8	-2166,4	50,6	-83,0	M ₂
4-CH ₃ -SO ₂ -	<i>S</i> 7,77	-2221,7	-2169,6	22,1	-74,2	M ₃
	<i>R</i> 6,39	-2204,6	-2169,6	22,1	-57,1	M ₃
4-F ₃ CO-	<i>S</i> 8,40	-2224,4	-2169,6	23,9	-78,7	M ₃
	<i>R</i> 7,08	-2211,4	-2169,6	23,9	-65,7	M ₃
4- <i>tert</i> -C ₄ H ₉ -	<i>S</i> 7,84	-2216,8	-2169,6	23,9	-71,1	M ₃
	<i>R</i> 7,52	-2211,3	-2169,6	23,9	-65,6	M ₃
4-(CH ₃) ₂ N-	<i>S</i> 7,46	-2199,6	-2169,6	43,9	-73,9	M ₃
	<i>R</i> 7,08	-2189,3	-2169,6	43,9	-63,6	M ₃
Dioxolo-**	- 8,22	-2192,6	-2169,6	50,6	-73,6	M ₃
4,4'-bis(F ₃ CO-)	- 8,24	-2225,6	-2169,6	22,9	-78,9	M ₃

* experimentell durch Radioligand-Bindungsstudien ermittelter pKi-Wert (Kap. 3.4)

**



Die generell höheren experimentellen Affinitäten der *S*-Enantiomere im Vergleich zu den *R*-Enantiomeren konnten an sämtlichen Rezeptorsubtypen (M_1 , M_2 , M_3) mit den berechneten WWE bestätigt werden (Tab. 25, Abb. 33). Die Affinitätsreihenfolge der Rezeptorsubtypen ($M_1 > M_3 > M_2$) wird überwiegend durch die berechneten Wechselwirkungsenergien wiedergegeben. Eine Ausnahme stellt die *S*-konfigurierte *tert*-Butylverbindung mit einer negativeren WWE(M_2) als WWE(M_3) dar. Da der hydrophobe Charakter der *S*-Bindungsseite von M_3 zu M_2 zunimmt, ist verständlich, weshalb zunächst eine negativere WWE für M_2 berechnet wurde. Jedoch wird mit Zunahme des hydrophoben Charakters der *S*-Bindungsseite gleichzeitig die Bindungstasche durch die raumfüllenden Aminosäurereste (Ile200, Ile201) enger. Dies führt zu einer vermehrten sterischen Hinderung, welche durch die berechnete WWE nicht exakt reflektiert wird. Die Möglichkeiten der qualitativen wie auch quantitativen Interpretation der experimentellen Bindungsdaten durch die erarbeiteten Rezeptormodelle wird durch eine eindrucksvolle Korrelation ($R^2 = 0,857$) zwischen Wechselwirkungsenergie und den experimentellen pKi-Werten belegt (Diagramm 6).

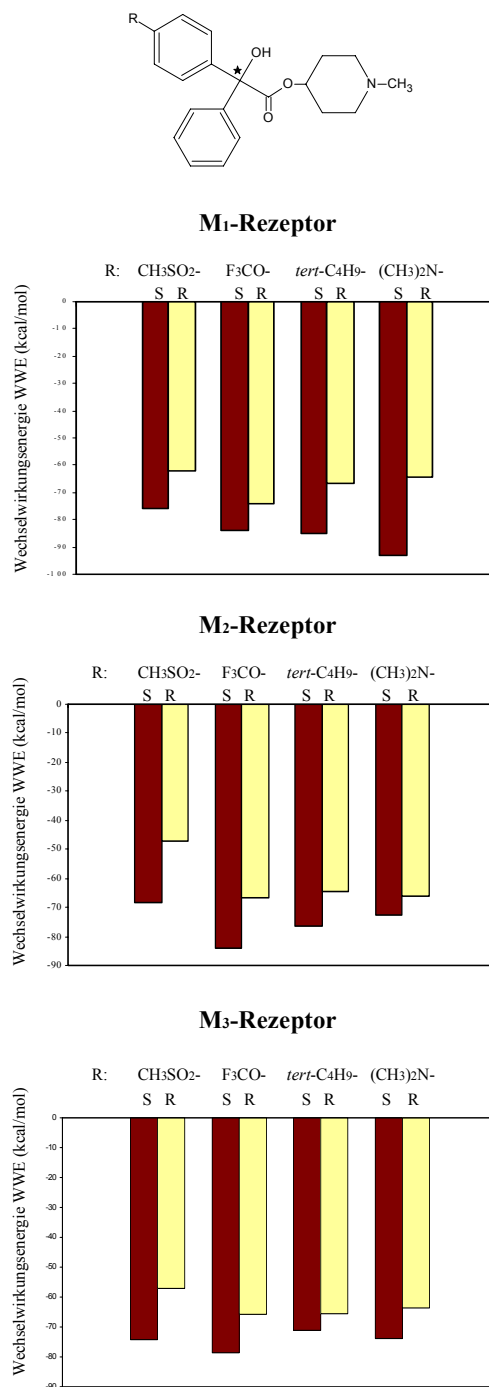


Abb. 33: Wechselwirkungsenergien (WWE) für *S*- und *R*-enantiomere Benzilate an M_1 -, M_2 - und M_3 -Rezeptoren

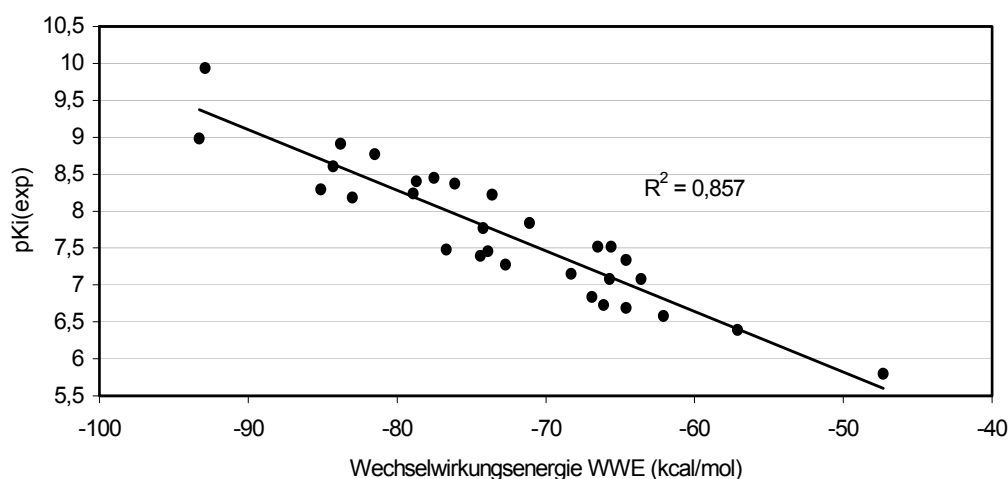


Diagramm 6: Korrelation zwischen experimentellen pKi-Werten (pKi(exp)) und berechneten Wechselwirkungsenergien (WWE)

3.5.4 Diskussion

Mit Molecular Modelling ist es gelungen, ein aussagekräftiges Rezeptormodell für die antagonistisch wirkenden Benzilate an Muscarinrezeptoren M₁, M₂ und M₃ zu erarbeiten. Dabei gelang es, durch die gefundene und beschriebene Ligandbindungsstelle

- ☐ die Stereoselektivität der enantiomeren Verbindung und
- ☐ die Subtypenselektivität an den Muscarinrezeptoren

qualitativ umfassend zu erklären. Die an der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung beteiligten Aminosäuren, insbesondere das konservierte Asp105, sowie das für die Rezeptoraktivierung diskutierte Trp378, stehen in Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Aminosäuren und deren Wechselwirkung mit Agonisten und Antagonisten. Von der Lage der gefundenen Ligandbindungsstelle kann mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgegangen werden. Die Relevanz einzelner Aminosäuren für die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung in der vorgeschlagenen Bindungstasche wurde durch Mutationsstudien unter anderem durch HULME et al. [100] für Antagonisten wie NMS oder Chinuclidinyl benzilat dokumentiert. Ein Nachteil der Mutationsstudien ist, dass keine Aussage über den Beitrag des Proteinrückgrats zur Ligandwechselwirkung möglich ist, sondern lediglich die Ligandwechselwirkungen mit den Seitenketten der Aminosäuren genauer betrachtet werden. Weiterhin können keine Aussagen darüber getroffen werden, welchen Einfluss die Mutation auf die Gesamtstruktur eines Proteins hat, wenn keine Röntgenstrukturanalyse vorliegt. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch

Mutationen, welche entfernt vom aktiven Zentrum liegen, zu essentiellen Strukturänderungen und damit zu einer veränderten Bindungsaffinität führen.

Die Berechnungen der Wechselwirkungsenergien und deren bemerkenswerte Korrelation zu den experimentellen Bindungsdaten unterstreichen, welche Aussagekraft die Rezeptormodelle in Hinsicht auf die Affinität enantiomerer Benzilate besitzen. Damit könnten die Modelle in Zukunft unterstützend bei der Entwicklung neuer Liganden eingesetzt werden und wertvolle Hinweise für deren strukturelle Voraussetzungen liefern.

Indirekt dopaminerge Wirkung. Dopaminrezeptoren gehören wie die Muscarinrezeptoren zur Familie der rhodopsinähnlichen G-proteingekoppelten Rezeptoren. In vorliegenden Arbeiten konnte in pharmakologischen Untersuchungen eine indirekt dopaminerge Wirkung für N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat nachgewiesen werden. Wie ist diese indirekt dopaminerge Wirkung zu erklären? Ein rein hypothetischer aber sehr interessanter Ansatz soll an dieser Stelle kurz diskutiert werden. Der Überlegung nach müssten N-Methyl-4-piperidyl benzilate vielmehr antidopaminerge Wirkungen besitzen, vorausgesetzt Dopaminrezeptoren verfügen über eine ähnliche Bindungsstelle wie Muscarinrezeptoren. Erste Modellversuche an Dopaminrezeptoren zeigten eine Übereinstimmung relevanter Aminosäuren in der Bindungstasche, so dass auch hier eine antagonistische Wirkung zu erwarten wäre. Handelt es sich um nichtselektive Dopaminantagonisten, werden sämtliche Dopaminrezeptorsubtypen blockiert, unter anderem auch die präsynaptischen Dopaminautorezeptoren. Eine Blockade der präsynaptischen Dopaminautorezeptoren führt zu einer vermehrten Ausschüttung des Neurotransmitters Dopamin (indirekt dopaminerge Wirkung). Eine therapeutisch genutzte Verbindung mit prä- und postsynaptischem Dopaminantagonismus stellt Sulpirid dar. Die unterschiedlichen Wirkungen von dem atypischen Neuroleptikum Sulpirid in Abhängigkeit von der Dosierung werden dadurch erklärt, dass Sulpirid in niedriger Dosierung vor allem die präsynaptischen Dopaminrezeptoren blockiert (indirekt dopaminerg). In hoher Dosierung werden prä- und postsynaptische Rezeptoren gleichermaßen gehemmt (antidopaminerg) [114]. Die beobachtete indirekt dopaminerge Wirkung von N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat kann somit auf:

- ☐ selektive Blockade der präsynaptischen Dopaminrezeptoren oder
- ☐ eine dosisabhängige indirekt dopaminerge (in niedriger Dosierung) und antidopaminerge Wirkung (in hoher Dosierung)

zurückgeführt werden.

4 Experimenteller Teil

4.1 Allgemeine Bemerkungen

4.1.1 Geräte

☐ HPLC:

analytisch: HP 1090 M Series II (Hewlett Packard) mit Dioden-Array-Detektor

präparativ: Merck Hitachi HPLC-System mit L4000 UV Detektor, D-6000 Interface, L6200A Intelligent Pump

☐ MS: MS 5995 (Hewlett Packard) mit Direkteinlasssystem, Elektronenenergie 70 eV

☐ NMR: DPX 300 NMR-Spektrometer (Bruker)

☐ Röntgenkristallstrukturanalyse: 4-Kreis-Röntgenkristalldiffraktometer (STOE & CIE, Darmstadt)

☐ UV: Spektralphotometer UV-2101 PC (Shimadzu)

☐ CHN: CHNS-932-Analysator (Leco)

☐ Optische Drehung: Polarimeter 241 MC (Perkin Elmer)

☐ Circular dichroismus: Jasco-710, Spektropolarimeter

☐ Kapillarelektrophorese: Spectra Phoresis 500TM, TSP Thermo Separation Products, Darmstadt

☐ Heiztischmikroskop Thermogalen-GA-D-4/89 (Leica)

☐ Vakuumrotationsverdampfer Rotavapor R 111 (Büchi)

☐ Magnetrührer RCT basic (IKA Labortechnik)

☐ Kontaktthermometer ETS-D4 fuzzy (IKA[®] Werke)

☐ Ultraschallbad Sonorex RK 100 (Bandelin)

☐ UV-Lampe Nr. 022.9230, Leistung 8 W (Camag)

☐ Heizplatte 0 bis 250°C (Gerhardt)

☐ Membran-Vakuumpumpe Typ N 726.3FT.18 (KFN Neuberger GmbH)

☐ pH-Messgerät WTW pH 522 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten) mit Glaselektrode N 6280 (SCHOTT Geräte)

☐ Trockenschrank T 6030 (Heraeus Instruments)

Die Aufnahme der MS- und NMR-Spektren, die Anfertigung der Röntgenkristallstrukturanalysen, sowie die Elementaranalyse wurden am Institut für Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt.

Die umfangreichen Berechnungen für das Molecular Modelling erfolgten am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle an einer Workstation mit den Programmen MOE [105], PROCHECK [110] und SYBYL [109].

4.1.2 Lösungsmittel und Chemikalien

Acetanhydrid (Feinchemie Sebnitz), Aceton (Merck), Acetonitril gradient grade (Merck), Aluminiumchlorid (Aldrich), Ammoniak-Lösung 33 % (Ferak), Ammoniumacetat (Laborchemie Apolda), Ammoniumchlorid (Laborchemie Apolda), Argon (Air Liquide GmbH), Benzoylchlorid (Fluka), Benzylchlorid (Merck), 3-Bromanisol (Aldrich), Brombenzol (Aldrich), 1-Brom-4-butylbenzen (Aldrich), 1-Brom-4-n-butyloxybenzen (Synthon Chemicals GmbH), 4-Brom-N,N-dimethylanilin (Aldrich), Bromthioanisol (Aldrich), 1-Bromo-4-(trifluormethoxy)benzen (Aldrich), n-Butanol (Merck), 4-*tert*-Butylacetophenon (Aldrich), n-Butylbenzen (Aldrich), *tert*-Butylbenzen (Aldrich), Butylphenylether (Aldrich), 5-Chlor-1,3-dimethoxybenzen (Aldrich), Chloroform (Baker), Cyclohexan (Ferak), Deuteriochloroform $\geq 99,5$ % (Merck), (+)-O,O'-Dibenzoyl-D-weinsäure (Fluka), (-)-O,O'-Dibenzoyl-L-weinsäure (Fluka), (+)-Di-O,O'-p-toluyll-D-weinsäure (Fluka), (-)-Di-O,O'-p-toluyll-L-weinsäure (Fluka), Dichlormethan (Merck), Diethylamin (Merck), Diethylether (Baker), Dimethylformamid (Ferak), α,α -Dichlormethyl methyl ether (Aldrich), N,N-Dimethylanilin (Aldrich), Dimethylsulfat (Merck), Dimethylsulfoxid-D₆ $\geq 99,8$ % (Merck), Dinatriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat (Laborchemie Apolda), 1,4-Dioxan (Laborchemie Apolda), (+)-Di-O,O'-p-Toluyll-D-weinsäure (Fluka), Essigsäure 98 % (Fluka), Essigsäure 100 % (Merck), Ethanol (Baker), Ethoxalylchlorid (Aldrich), Ethylacetat (Aldrich), n-Hexan HPLC Reagent (Baker), 3-Hydroxy-N-methylpiperidin 98 % (Aldrich), 4-Hydroxy-N-methylpiperidin 98 % (Aldrich), Iod (Fluka), Isopropanol (Merck), Kaliumdihydrogenphosphat (Laborchemie Apolda), Kaliumhydroxid (Merck), Magnesiumspäne (Laborchemie Apolda), Methanol (Baker), Methanol gradient grade (Merck), 3-Methoxybenzaldehyd (Aldrich), 3-Methoxybenzamid (Aldrich), 3-Methoxyphenylbromid, Natrium (Merck), Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (Laborchemie Apolda), Natriumhydrogencarbonat (Merck), Natriumhydrogensulfit-Lösung 39 % (Merck), Natriumhydroxid (Chemapol), Natriumsulfat wasserfrei (Riedel-de-Haën), n-Octanol (Merck), Petroleumbenzin 60-80 °C (Baker), Phenylglyoxylsäuremethylester (Aldrich), (-)-8-Phenylmenthol (Aldrich), Phenyl trifluormethylether (Lancaster), Phosphorsäure (Laborchemie Apolda), 4-Piperidinol (Fluka), 2-Propanol HPLC Reagent (Baker), Salzsäure 36 % (Riedel-de-Haën), Schwefelsäure 96 % (Laborchemie Apolda), Selendioxid (Fluka), Stickstoff (Air Liquide GmbH), Tetrahydrofuran (Aldrich), Thioanisol (Aldrich), Toluol (Merck), Triethylamin (Aldrich), 4-Trifluormethylphenylbromid (Aldrich), (2*R*,3*S*)-Weinsäure (Merck).

Enzyme: Esterase solution porcine liver (PLE): Ammonium sulfate suspension min. 150 units/mg protein (biuret) (Aldrich), Lipase porcine pancreas (PPL): Type II 100-400 units/mg protein (using olive oil (30 min incubation)), 30-90 units/mg protein (using triacetin) (Aldrich), Lipase Pseudomonas cepacia (PCL): BioChemika powder Color light beige ~50 units/mg (Aldrich), Lipase Candida cylindracea (CCL): BioChemika lyophilized powder (fine) 15-25 units/mg.

Für Reaktionen wie Acylierungen und metallorganische Umsetzungen wurden getrocknete Lösungsmittel verwendet, die nach gängigen Methoden der Laborpraxis hergestellt wurden.

4.2 Vergleichssubstanzen

(*R,S*)-3-Methoxybenzilsäure, 89

$C_{15}H_{14}O_5$

M_r : 258,26 g/mol

F_p : 78-80°C (Ethylacetat/Petroleumbenzin), (75-80°C [5])

MS: m/z ($I_{rel.}$ [%]): M^+ 258 (2), 213 (29), 135 (10), 105 (100), 77 (62)

Synthese, Analytik: [5]

(*R,S*)-3,5-Dimethoxybenzilsäure, 90

$C_{16}H_{16}O_5$

M_r : 288,29 g/mol

F_p : 92-94°C (Methanol/Wasser), (94-96°C [5])

MS: m/z ($I_{rel.}$ [%]): M^+ 288 (3), 243 (11), 105 (100), 77 (45)

Synthese, Analytik: [5]

(*R,S*)-Methyl 3,5-dimethoxybenzilat, 91

$C_{17}H_{18}O_5$

M_r : 302,31 g/mol

F_p : 77-79°C (Methanol/Wasser), (77-78°C [5])

MS: m/z ($I_{rel.}$ [%]): M^+ 302 (3), 243 (18), 105 (100), 77 (41)

Synthese, Analytik: [5]

(*R,S*)-N-Methyl-4-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat, 92

$C_{22}H_{27}NO_5$

M_r : 385,47 g/mol

F_p : 107-108°C (Diethylether), (108-110°C [5])

MS: m/z ($I_{rel.}$ [%]): M^+ 385 (2), 243 (34), 105 (100), 99 (34), 98 (100), 96 (11), 77 (20)

Synthese, Analytik: [5]

(*R,S*)-N-Methyl-4-piperidyl 3,4-dihydroxybenzilat, 93

$C_{20}H_{23}NO_5$

M_r : 357,39 g/mol

F_p : 122-124°C (Diethylether), (121-123 °C [5])

MS: m/z ($I_{rel.}$ [%]): M^+ 357 (5), 215 (30), 137 (13), 114 (12), 105 (80), 98 (100), 77 (40)

Synthese, Analytik: [5]

(*R,S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-methoxybenzilat, 94

$C_{21}H_{25}NO_4$

M_r : 355,43 g/mol

F_p : 133-135°C (Chloroform/Diethylether), (134-136°C [115])

Synthese, Analytik: [115]

(*R,S*)-N-Methyl-3-piperidyl (*R,S*)-3-methoxybenzilat, 95

$C_{21}H_{25}NO_4$

M_r : 355,42 g/mol

F_p : 93-95°C (Diethylether), (91-95°C [5])

MS: m/z ($I_{rel.}$ [%]): kein M^+ , 105 (30), 98 (12), 97 (100), 96 (11), 77 (18)

Synthese, Analytik: [5]

(*R,S*)-N-Methyl-3-piperidyl (*R,S*)-3,5-dimethoxybenzilat, 96

$C_{22}H_{27}NO_5$

M_r : 385,47 g/mol

MS: m/z ($I_{rel.}$ [%]): kein M^+ , 243 (10), 114 (14), 105 (26), 97 (100), 77 (15)

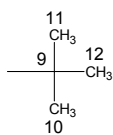

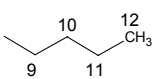
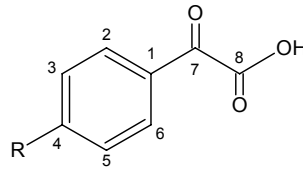
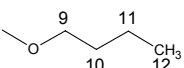
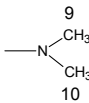

Synthese, Analytik: [5]

4.3 Allgemeine Synthesevorschriften und dargestellte Verbindungen

4.3.1 Darstellung enantiomerenreiner substituierter N-Methyl-4-piperidyl benzilate

4.3.1.1 Darstellung substituierter Phenylglyoxylsäuren

Tab. 26: Bezifferung der Phenylglyoxylsäuren

Nr.	Substitution R	Formel
19		
20		
21		
22		
23		
24		

4-*tert*-Butylphenylglyoxylsäure, 19

CAS: 7099-90-3

C₁₂H₁₄O₃

M_r: 206,24 g/mol

Synthese: 28 mmol (5 g) 4-*tert*-Butylacetophenon werden unter Eiskühlung zu einer Lösung von 59 mmol (9,3 g) Kaliumpermanganat und 83 mmol (3,3 g) Natriumhydroxid in 600 ml Wasser getropft. Es wird über Nacht unter Eiskühlung gerührt. Der Braunstein wird abfiltriert. Die Lösung wird 2 h bei Raumtemperatur mit Aktivkohle gerührt und nach dem Abfiltrieren der Aktivkohle auf pH 6 mit Salzsäure eingestellt. Um unerwünschte saure organische Verbindungen zu entfernen, wird die wässrige Phase bei pH 6 (7-8mal), pH 4 (dreimal) und pH 2 (dreimal) mit Chloroform extrahiert. Die zuletzt erhaltenen Chloroform-Extrakte (pH 2) werden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, anschließend filtriert, im Vakuum eingengt und liefern 2,8 g 4-*tert*-Butylphenylglyoxylsäure [29].

Ausbeute: 48 % d. Th.

F_p: 69-73°C (69-71°C [119])

DC: FM II: $R_f = 0,27$
 Detektion: A, B (gelb)

$^1\text{H-NMR}$: δ_{H} [ppm] (300 MHz, CDCl_3 , TMS): 1,28 s (9H, CH_3 , C-10 bis C-12; 7,46-7,49 d (2H, Ar- $\underline{\text{H}}$, C-3, C-5); 8,18-8,21 d (2H, Ar- $\underline{\text{H}}$, C-2, C-6)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ_{C} [ppm] (75 MHz, CDCl_3 , TMS): 30,9 (C-10 bis C-12); 35,5 (C-9); 126,0 (C-3, C-5); 129,1 (C-1); 131,3 (C-2, C-6); 160,0 (C-4); 162,1 (C-8); 183,9 (C-7)

MS: m/z ($I_{\text{rel.}}$ [%]): M^+ 206 (1), 178 (22), 163 (100), 161 (85), 135 (24), 118 (11), 91 (26), 77 (11)

4-Methylmercaptophenylglyoxylsäure, 20

CAS: 53066-99-2

$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3\text{S}$

M_r : 196,22 g/mol

Synthese: 73 mmol (9 g) Thioanisol und 73 mmol (10 g) Ethoxalylchlorid werden in 100 ml getrocknetem Dichlorethan gelöst und gekühlt. 74 mmol (10 g) Aluminiumchlorid werden portionsweise hinzugegeben. Die Mischung wird 1 h unter Kühlung, dann 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird auf Eis/konz. Salzsäure geschüttet. Die Phasen werden getrennt. Die wässrige Phase wird 3mal mit Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen werden vereint und mit Wasser gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, anschließend filtriert und im Vakuum eingeeengt. Der Ester (9,5 g) wird mit einer Lösung aus 6,1 g Natriumhydroxid in 100 ml Wasser 1,5 h auf dem Wasserbad verseift und nach dem Abkühlen zweimal mit Diethylether gewaschen. Dann wird die wässrige Phase angesäuert und mit Diethylether extrahiert. Der Etherextrakt wird gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, anschließend filtriert und im Vakuum eingeeengt. Die erhaltene Säure wird in Toluol umkristallisiert [116].

Ausbeute: 31 % d. Th. (2 Stufen)

F_p : 109-112°C (Toluol), (111-113°C [116])

DC: FM II: $R_f = 0,23$

Detektion: A, B (gelb)

$^1\text{H-NMR}$: δ_{H} [ppm] (300 MHz, CDCl_3 , TMS): 2,48 s (3H, CH_3 , C-9); 7,22-7,25 d (2H, Ar- $\underline{\text{H}}$, C-3, C-5); 8,22-8,25 d (2H, Ar- $\underline{\text{H}}$, C-2, C-6)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ_{C} [ppm] (75 MHz, CDCl_3 , TMS): 14,5 (C-9); 124,8 (C-3, C-5); 127,7 (C-1); 131,7 (C-2, C-6); 150,5 (C-4); 161,1 (C-8)

MS: m/z ($I_{\text{rel.}}$ [%]): M^+ 196 (19), 168 (13), 151 (100), 123 (13), 108 (10), 79 (8), 77 (5)

4-n-Butylphenylglyoxylsäure, 21

CAS: 128822-59-3

C₁₂H₁₄O₃

M_r: 206,24 g/mol

Synthese: 7,5 mmol (1 g) Aluminiumchlorid werden in 15 ml Dichlormethan unter Eiskühlung gegeben. 7,4 mmol (1 g) Ethoxalylchlorid werden vorsichtig dazu getropft. 7,5 mmol (1 g) n-Butylbenzen werden unter weiterem Rühren und Kühlen innerhalb 0,5 h hinzugefügt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch 5 h bei Raumtemperatur weitergerührt, dann unter heftigem Umschütteln auf fein zerstoßenes Eis gegossen. Die organische Schicht wird mit Wasser, Natriumhydrogencarbonat- und Kochsalz-Lösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Der Ester wird durch Säulenchromatographie (Kieselgel 60, Cyclohexan/Ethylacetat 7:3) gereinigt. Anschließend wird der Ester (1,2 g) mit 15 ml einer 6 %igen Natriumhydroxid-Lösung 1,5 h auf dem Wasserbad verseift und nach dem Abkühlen zweimal mit Diethylether gewaschen. Dann wird die wässrige Phase angesäuert und mit Diethylether extrahiert. Der Etherextrakt wird getrocknet und einrotiert [117].

Ausbeute: 51 % d. Th. (2 Stufen)

DC: FM II: R_f = 0,21

Detektion: A, B (gelb)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 0,83-0,88 t (3H, CH₃, C-12); 1,28 m (2H, CH₂, C-11); 1,55 m (2H, CH₂, C-10); 1,97 t (2H, CH₂, C-9); 7,24-7,26 d (2H, Ar-H, C-3, C-5); 8,08-8,11 d (2H, Ar-H, C-2, C-6)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 13,8 (C-12); 22,3 (C-11); 33,0 (C-10); 35,9 (C-9); 129,1 (C-3, C-5); 129,5 (C-1); 131,2 (C-2, C-6); 151,9 (C-4); 163,4 (C-8); 184,7 (C-7)

MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 206 (2), 178 (20), 161 (100), 149 (9), 136 (26), 91 (35), 77 (6)

4-Butoxyphenylglyoxylsäure, 22

C₁₂H₁₄O₄

M_r: 222,24 g/mol

Synthese: 20 mmol (2,7 g) Aluminiumchlorid werden in 45 ml Dichlormethan unter Eiskühlung suspendiert. 20 mmol (2,7 g) Ethoxalylchlorid werden vorsichtig dazu getropft. Innerhalb von 0,5 h werden 20 mmol (3 g) Butoxybenzen unter weiterem Rühren und Kühlen hinzugefügt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch 5 h bei Raumtemperatur gerührt, dann unter heftigem Umschütteln auf fein zerstoßenes Eis gegossen. Die organische Schicht wird mit Wasser, Natriumhydrogencarbonat- und Kochsalz-Lösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Der 4-Butoxyphenylglyoxylsäureethylester wird ohne weitere Reinigungsschritte mit einer 6 %igen Natriumhydroxid-Lösung 1,5 h auf dem Wasserbad verseift. Nach dem Abkühlen wird das Gemisch zweimal mit Diethylether geschüttelt, um den nichtverseiften Ester zu

entfernen. Dann wird die wässrige Phase mit konz. Salzsäure angesäuert und mit Diethylether extrahiert. Der Etherextrakt wird über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, anschließend filtriert und im Vakuum eingedunstet.

Ausbeute: 53 % d. Th. (2 Stufen)

F_p: 60-61°C (Cyclohexan), (61-62°C [120])

DC: FM II: R_f = 0,41

Detektion: A, B (gelb), C (grau)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 0,90-0,95 t (3H, CH₃, C-12); 1,44 m (2H, CH₂, C-11); 1,74 m (2H, CH₂, C-10); 4,01 t (2H, CH₂, C-9); 6,89-6,92 d (2H, Ar-H, C-3, C-5); 8,37-8,40 d (2H, Ar-H, C-2, C-6)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 13,8 (C-12); 19,1 (C-11); 31,0 (C-10); 68,3 (C-9); 114,8 (C-3, C-5); 124,3 (C-1); 134,6 (C-2, C-6); 165,6 (C-4); 167,6 (C-8); 178,1 (C-7)

MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 222 (9), 177 (85), 121 (100), 93 (15)

4-Dimethylaminophenylglyoxylsäure, 23

C₁₀H₁₁O₃

M_r: 193,20 g/mol

Synthese: [121]

Ausbeute: 68 % d. Th.

F_p: 192-194°C (Wasser/Methanol), (194-195°C [116])

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 3,08 s (6H, CH₃, C-9, C-10); 6,61-6,64 d (2H, Ar-H, C-3, C-5); 8,39-8,42 d (2H, Ar-H, C-2, C-6)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 40,1 (C-9, C-10); 111,1 (C-3, C-5); 119,3 (C-1); 134,8 (C-2, C-6); 155,1 (C-4); 160,9 (C-8); 179,0 (C-7)

MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 193 (20), 149 (12), 148 (100), 105 (11), 79 (10), 77 (16)

4-Trifluormethoxyphenylglyoxylsäure, 24

C₉H₅F₃O₄

M_r: 234,1 g/mol

Synthese: 60 mmol (8 g) Aluminiumchlorid werden in 60 ml Dichlorethan unter Eiskühlung suspendiert. 53 mmol (7,3 g) Ethoxalylchlorid werden vorsichtig dazugetropft. 50 mmol (8,1 g) Trifluormethoxybenzen werden unter weiterem Rühren und Kühlen innerhalb von 0,5 h hinzugefügt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch 5 h bei 50°C erwärmt [118]. Unter heftigem Umschütteln wird das Reaktionsgemisch auf fein zerstoßenes Eis gegossen. Die organische Schicht wird abgetrennt, mit Wasser, Natriumhydrogencarbonat- und Kochsalz-Lösung gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedunstet. Der Ester wird durch Säulenchromatographie (Kieselgel, Hexan/Ethylacetat 9:1) gereinigt. Danach wird 1 Moläquivalent Ester mit 5 Moläquivalenten einer 3 N Natriumhydroxid-Lösung (Wasser/Ethanol 1:1) 0,5 h auf dem Wasserbad verseift. Das Reaktionsgemisch wird im Vakuum eingedunstet. Mit Chloroform werden die nicht verseiften Bestandteile extrahiert. Zur

Entfernung saurer Nebenprodukte wird die wässrige Lösung mit 6 N Salzsäure angesäuert und mit Chloroform extrahiert. Durch weitere Extraktion der sauren Lösung mit Diethylether wird die in Chloroform sehr schlecht bis unlösliche 4-Trifluormethoxyphenylglyoxylsäure erhalten. Die organische Phase wird über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt.

Ausbeute: 20 % (2 Stufen)

$^1\text{H-NMR}$: δ_{H} [ppm] (300 MHz, DMSO- d_6 , TMS): 6,91-6,94 d (2H, Ar-H, C-3, C-5); 7,77-7,80 d (2H, Ar-H, C-2, C-6); 10,81 (1H, OH)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ_{C} [ppm] (75 MHz, DMSO- d_6): 116,1 (C-3, C-5); 123,3 (C-1); 132,3 (C-2, C-6); 163,9 (C-4); 166,8 (C-8); 188,1 (C-7)

MS: m/z ($I_{\text{rel.}}$ [%]): kein M^+ , 166 (4), 122 (10), 121 (100), 93 (35), 77 (16)

4.3.1.2 Darstellung der (-)-8-Phenylmenthylester der unsubstituierten/substituierten Phenylglyoxylsäure

(-)-8-Phenylmenthyl phenylglyoxylat (**25**), (-)-8-Phenylmenthyl 4-*tert*-butylphenylglyoxylat (**26**), (-)-8-Phenylmenthyl 4-methylmercaptophenylglyoxylat (**27**), (-)-8-Phenylmenthyl 4-*n*-butylphenylglyoxylat (**28**), (-)-8-Phenylmenthyl 4-butoxyphenylglyoxylat (**29**): 4,3 mmol der unsubstituierten/substituierten Phenylglyoxylsäure werden mit 4,3 mmol α,α -Dichlormethyl methyl ether bei 50°C 2 h behandelt. Danach wird die Lösung mit 15 ml Dichlormethan verdünnt. Inzwischen werden 4,3 mmol (-)-8-Phenylmenthol in 15 ml Dichlormethan gelöst, auf 0°C abgekühlt und 1 ml Triethylamin wird hinzugefügt. Anschließend wird die Lösung des Phenylglyoxylsäurechlorids innerhalb von 20 min zur (-)-8-Phenylmenthol-Lösung hinzugegotropft. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zum Reaktionsgemisch werden 20 ml Wasser gegeben. Die organische Schicht wird abgetrennt, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Die Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie [6].

Tab. 27: Bezifferung der (-)-8-Phenylmenthyl phenylglyoxylate

Nr.	Substitution R	Formel
25	H	
26		
27		
28		
29		

(-)-8-Phenylmenthyl phenylglyoxylat, 25

$C_{24}H_{28}O_3$

M_r : 364,48 g/mol

Reinigung: Säulenchromatographie, n-Hexan/Ethylacetat 8:2

Ausbeute: 81 % d. Th.

F_p : 57-60°C (Ethanol)

DC: FM I: $R_f = 0,69$

Detektion: A, B (gelb)

1H -NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, $CDCl_3$, TMS): 0,77-1,58 m (15H, \underline{CH}_3 , C-22 bis C24, \underline{CH}_2 , C-10, C-12, C-13, \underline{CH} , C-11); 1,97-2,07 m (2H, \underline{CH}_2 , C-10, \underline{CH} , C-14);

4,91-5,00 m (1H, CH, C-9); 6,91-6,96 t (1H, Ar-H, C-19); 7,02-7,07 m (2H, Ar-H, C-18, C-20); 7,15-7,19 d (2H, Ar-H, C-17, C-21); 7,41-7,43 m (2H, Ar-H, C-3, C-5); 7,58 m (1H, Ar-H, C-4); 7,88-7,90 d (2H, Ar-H, C-2, C-6)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 21,7 (C-24); 26,1 (C-11); 26,9 (C-13); 27,4 (C-22, 23); 31,4 (C-22, C-23); 34,4 (C-12); 40,0 (C-15); 41,4 (C-10); 50,5 (C-14); 77,5 (C-9); 125,3 (C-19); 125,5 (C-17, C-21); 128,0 (C-18, C-20); 128,7 (C-3, C-5); 130,1 (C-2, C-6); 132,6 (C-1); 134,6 (C-4); 150,3 (C-16); 162,7 (C-8); 184,6 (C-7)

(-)-8-Phenylmenthyl 4-*tert*-butylphenylglyoxylat, 26

C₂₈H₃₆O₃

M_r: 420,58 g/mol

Reinigung: Säulenchromatographie, n-Hexan/Ethylacetat 8:2

Ausbeute: 83 % d. Th.

DC: FM I: R_f = 0,77

Detektion: A, B (gelb)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 0,76-1,55 m (24H, CH₃, C-22 bis C-24, C-26 bis C-28, CH₂, C-10, C-12, C-13, CH, C-11); 1,94-2,07 m (2H, CH₂, C-10, CH, C-14); 4,91-4,99 m (1H, CH, C-9); 6,93-6,98 (1H, Ar-H, C-19); 7,04-7,09 m (2H, Ar-H, C-18, C-20); 7,16-7,19 d (2H, sAr-H, C-3, C-5); 7,43-7,46 d (2H, Ar-H, C-17, C-21); 7,82-7,84 d (2H, sAr-H, C-2, C-6)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 21,7 (C-24); 25,7 (C-11); 26,9 (C-13); 28,0 (C-22, 23); 31,0 (C-26 bis C-28); 31,4 (C-22, 23); 34,4 (C-12); 40,1 (C-15); 41,4 (C-10); 50,5 (C-14); 77,4 (C-9); 125,3 (C-19); 125,5 (C-3, C-5); 125,7 (C-17, C-21); 128,0 (C-18, C-20); 130,0 (C-1); 130,1 (C-2, C-6); 150,2 (C-16); 158,7 (C-4); 163,0 (C-8); 185,5 (C-7)

MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 420 (0,1), 163 (16), 162 (11), 161 (82), 133 (7), 119 (100), 105 (84), 91 (56), 77 (10)

(-)-8-Phenylmenthyl 4-methylmercaptophenylglyoxylat, 27

C₂₅H₃₀O₃S

M_r: 410,57 g/mol

Reinigung: Säulenchromatographie, n-Hexan/Ethylacetat 9:1

Ausbeute: 56 % d. Th.

DC: FM I: R_f = 0,58

Detektion: A, B (gelb)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 0,77-1,58 m (15H, CH₃, C-22 bis C-24, CH₂, C-10, C-12, C-13, CH, C-11); 1,95-2,04 m (2H, CH₂, C-10, CH, C-14); 2,48 s (3H, CH₃, C-25); 4,89-4,98 m (1H, CH, C-9); 6,92-6,94 m (1H, Ar-H, C-19); 7,03-7,08 m (2H, Ar-H, C-18, C-20); 7,15-7,23 m (4H, Ar-H, C-17, C-21, sAr-H, C-3, C-5); 7,79-7,82 d (2H, sAr-H, C-2, C-6)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 14,6 (C-25); 21,7 (C-24); 26,1 (C-11); 26,9 (C-13); 27,5 (C-22, 23); 31,4 (C-22, C-23); 34,4 (C-12); 40,0 (C-15); 41,4 (C-10); 50,5 (C-14); 77,4 (C-9); 124,8 (C-3, C-5); 125,3 (C-19); 125,5

(C-17, C-21); 128,0 (C-18, C-20); 128,8 (C-1); 130,4 (C-2, C-6); 148,4 (C-4); 150,3 (C-16); 162,7 (C-8); 184,6 (C-7)
MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 410 (1), 214 (4), 151 (2), 119 (100), 105 (11), 91 (19)

(-)-8-Phenylmenthyl 4-n-butylphenylglyoxylat, 28

C₂₈H₃₆O₃

M_r: 420,58 g/mol

Reinigung: Säulenchromatographie, n-Hexan/Ethylacetat 7:3

Ausbeute: 81 % d. Th.

DC: FM I: R_f = 0,9

Detektion: A, B (gelb)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 0,77-2,07 m (24H, CH₃, C-22 bis C-24, C-28, CH₂, C-10, C-12, C-13, C-26, C-27, CH, C-11, C-14); 2,60-2,65 t (2H, CH₂, C-25); 4,90-4,99 m (1H, CH, C-9); 6,92-7,34 m (7H, Ar-H, C-17 bis C-21, sAr-H, C-3, C-5); 7,79-7,82 d (2H, sAr-H, C-2, C-6)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 13,9 (C-28); 21,7 (C-24); 22,3 (C-27); 25,8 (C-11); 26,9 (C-13); 27,8 (C-22, 23); 31,4 (C-22, C-23); 33,1 (C-26); 34,3 (C-12); 35,9 (C-25); 40,0 (C-15); 41,4 (C-10); 50,5 (C-14); 77,4 (C-9); 125,3 (C-19); 125,5 (C-17, C-21); 127,9 (C-18, C-20); 128,8 (C-3, C-5); 130,2 (C-2, C-6); 150,2 (C-16); 150,7 (C-4); 163,0 (C-8); 185,5 (C-7)

MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 420 (1), 301 (1), 214 (8), 161 (12), 132 (3), 119 (100), 105 (23), 91 (36)

(-)-8-Phenylmenthyl 4-butoxyphenylglyoxylat, 29

C₂₈H₃₆O₄

M_r: 436,58 g/mol

Reinigung: Säulenchromatographie, n-Hexan/Ethylacetat 9:1

Ausbeute: 57 % d. Th.

DC: FM I: R_f = 0,69

Detektion: A, B (gelb), C (grau-violett)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 0,77-2,06 m (24H, CH₃, C-22 bis C-24, C-28, CH₂, C-10, C-12, C-13, C-26, C-27, CH, C-11, C-14), 3,96-4,01 t (2H, CH₂, C-25); 4,89-4,97 m (1H, CH, C-9); 6,86-6,89 d (2H, sAr-H, C-3, C-5); 6,95 t (1H, Ar-H, C-19); 7,07 t (2H, Ar-H, C-18, C-20); 7,16-7,18 d (2H, Ar-H, C-17, C-21); 7,86-7,89 d (2H, sAr-H, C-2, C-6)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 13,8 (C-28); 19,1 (C-27); 21,7 (C-24); 25,7 (C-11); 27,0 (C-13); 27,9 (C-22, 23); 31,0 (C-26); 31,4 (C-22, C-23); 34,4 (C-12); 40,0 (C-15); 41,4 (C-10); 50,5 (C-14); 68,1 (C-25); 77,4 (C-9); 114,5 (C-3, C-5); 125,3 (C-19); 125,4 (C-1); 125,5 (C-17, C-21); 127,9 (C-18, C-20); 132,6 (C-2, C-6); 150,2 (C-16); 163,2 (C-4); 164,4 (C-8); 184,3 (C-7)

MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 436 (2), 318 (2), 223 (7), 214 (10), 177 (100), 149 (4), 121 (47), 119 (165), 105 (71), 91 (20)

4.3.1.3 Darstellung der (-)-8-Phenylmenthyl benzilate

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der GRIGNARD-Reagenzien. 7,4 mmol Magnesiumspäne werden mit ca. 4 ml Tetrahydrofuran übergossen. Etwa 1/20 von insgesamt 6,8 mmol des substituierten Phenylbromids wird unter Rühren dazugegeben. Nach dem Anspringen der Reaktion, welches durch eine leichte Trübung und Erwärmung erkennbar ist, wird das restliche Arylhalogenid (gelöst in ca. 5 ml Tetrahydrofuran) dazugetrofft. Dann wird zum gelinden Sieden erhitzt, bis das gesamte Magnesium gelöst ist [118].

3,5-Dimethoxyphenylmagnesiumchlorid: wird aus 10,2 mmol Magnesiumspäne und 6,8 mmol 5-Chlor-1,3-dimethoxybenzen unter Zugabe von 25 µl Dibromethan in Tetrahydrofuran erhalten.

Methode A (S-konfigurierte Benzilate). (-)-8-Phenylmenthyl (*S*)-4-*tert*-butyl-benzilat (**30**), (-)-8-Phenylmenthyl (*S*)-4-methylmercaptobenzilat (**31**), (-)-8-Phenylmenthyl (*S*)-4-*n*-butyl benzilat (**32**), (-)-8-Phenylmenthyl (*S*)-4-butoxy-benzilat (**33**), (-)-8-Phenylmenthyl (*S*)-4-dimethylaminobenzilat (**34**), (-)-8-Phenylmenthyl (*S*)-4-trifluormethoxybenzilat (**35**), (-)-8-Phenylmenthyl (*S*)-4-trifluormethylbenzilat (**36**), (-)-8-Phenylmenthyl (*S*)-3,5-dimethoxybenzilat (**37**), (-)-8-Phenylmenthyl (*S*)-3-methoxybenzilat (**38**): Eine Lösung von 2,8 mmol unsubstituiertem (-)-8-Phenylmenthyl phenylglyoxylat (**25**) in 15 ml Tetrahydrofuran wird in einer Trockeneis/Aceton-Mischung auf -78°C gekühlt. Über einen Zeitraum von 5-10 min wird das entsprechend substituierte GRIGNARD-Reagenz zum (-)-8-Phenylmenthyl phenylglyoxylat zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird für 2 h bei -78°C gerührt, anschließend auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht weitergerührt [6].

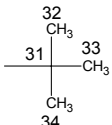
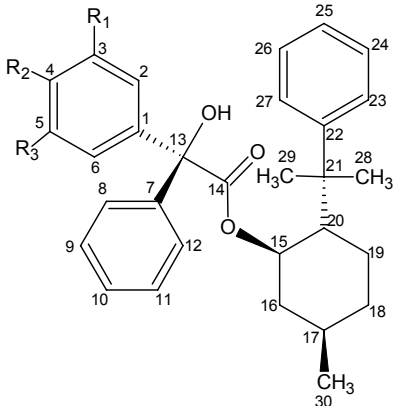

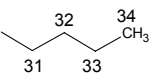
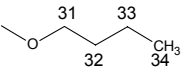
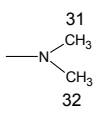






Aufarbeitung:

Variante A: Die Lösung wird mit 40 ml 10 %iger Ammoniumchlorid-Lösung versetzt und zweimal mit Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen werden vereint, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Die Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie.

Variante B: Die Lösung wird mit 40 ml 10 %iger Ammoniumchlorid-Lösung versetzt und zweimal mit Chloroform extrahiert. Anschließend wird die wässrige Phase mit 6 N Natriumhydroxid-Lösung alkalisiert und dreimal mit Chloroform ausgeschüttelt. Die organischen Phasen werden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Die Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie.

(-)-8-Phenylmenthyl (*S*)-4-methylsulfonylbenzilat (**39**): 2 mmol (-)-8-Phenylmenthyl 4-methylmercaptobenzilat (**31**) werden in 20 ml Dichlormethan gelöst und mit einer Lösung aus 4 mmol 3-Chlorperbenzoesäure (55 %) in 10 ml Dichlormethan behandelt. Die Lösung wird 90 min stehen gelassen, dreimal mit 10 % Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit Wasser gewaschen [122]. Die organische Phase wird getrocknet und einrotiert. Die Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie.

Tab. 28: Bezifferung der *S*-konfigurierten* (-)-8-Phenylmenthyl benzilate

Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	Formel
30	H		H	
31	H		H	
32	H		H	
33	H		H	
34	H		H	
35	H		H	
36	H		H	
37		H		
38		H	H	
39	H		H	

* die absolute Konfiguration bezieht sich auf das asymmetrische C-Atom im Benzilsäurerest

(-)-8-Phenylmenthyl (*S*)-4-*tert*-butylbenzilat, 30

C₃₄H₄₂O₃

M_r: 498,70 g/mol

Aufarbeitung: Variante A

Reinigung: Säulenchromatographie: n-Hexan/Ethylacetat 9,5:0,5

Ausbeute: 85 % d. Th.

DC: FM I: R_f = 0,74

Detektion: A, C (himbeerrot)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 0,77-1,53 m (24H, CH₃, C-30 (0,77-0,79 d), C-28, C-29 (0,89 s und 1,00 s), C-32 bis C-34 (1,27 s), CH₂, C-16, C-18, C-19, CH, C-17); 1,93 m (2H, CH₂, C-16; CH, C-20), 4,80 m (1H, CH, C-15); 7,02-7,30 m (14H, sAr-H, C-2, C-3, C-5, C-6, Ar-H, C-8

bis C-12, C-23 bis C-27)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 21,7 (30); 26,0 (C-28,29); 26,7 (C-28,29); 26,9 (C-19); 31,3 (C-32 bis C-34); 34,4 (C-18); 39,6 (C-21), 41,0 (C-16); 50,1 (C-20); 78,1 (C-15); 80,7 (C-13); 124,9 (C-3, C-5); 125,2 (C-25); 125,3 (C-23, C-27); 127,0 (C-8, C-12); 127,2 (C-2, C-6); 127,7 (C-10); 127,8 (C-24, C-26); 128,0 (C-9, C-11); 138,9 (C-1); 141,8 (C-7); 151,0 (C-4, C-22); 172,3 (C-14)

MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 498 (1), 239 (47), 161(13), 119 (62), 105 (100), 91 (37), 77 (24)

(-)-8-Phenylmenthyl (S)-4-methylmercaptobenzilat, 31

C₃₁H₃₆O₃S

M_r: 488,68 g/mol

Aufarbeitung: Variante A

Reinigung: Säulenchromatographie: n-Hexan/Ethylacetat 9:1

Ausbeute: 88 % d. Th.

DC: FM I: R_f = 0,57

Detektion: A, C (rosa)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 0,71-1,57 m (15H, CH₃, C-30 (0,77-0,79 d), C-28, C-29 (0,93 s und 1,01 s), CH₂, C-16, C-18, C-19, CH, C-17); 1,97 m (2H, CH₂, C-16, CH, C-20); 2,44 s (3H, S-CH₃, C-31); 4,76-4,83 m (1H, CH, C-15); 7,22 m (14H, sAr-H, C-2, C-3, C-5, C-6, Ar-H, C-8 bis C-12, C-23 bis C-27)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 15,6 (C-31); 21,7 (C-30); 25,4 (C-28,29); 26,8 (C-19); 27,3 (C-17); 31,3 (C-28,29); 34,4 (C-18); 39,5 (C-21), 40,9 (C-16); 50,0 (C-20); 78,1 (C-15); 80,5 (C-13); 125,2 (C-23, C-25, C-27); 125,7 (C-3, C-5); 127,1 (C-8, C-12); 127,8 (C-2, C-6, C-10); 128,0 (C-24, C-26); 128,1 (C-9, C-11); 138,2 (C-4); 138,6 (C-1); 141,9 (C-7); 151,21 (C-22); 171,9 (C-14)

MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 488 (4), 229 (100), 151 (42), 119 (54), 105 (53), 91 (27), 77 (23)

(-)-8-Phenylmenthyl (S)-4-n-butylbenzilat, 32

C₃₄H₄₂O₃

M_r: 498,70 g/mol

Aufarbeitung: Variante A

Reinigung: Säulenchromatographie: n-Hexan/Ethylacetat 9,5:0,5

Ausbeute: 63 % d. Th.

DC: FM I: R_f = 0,86

Detektion: A, C (weinrot)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 0,77-2,02 m (24H, CH₃, C-28, C-29 (0,90 s und 1,01 s), C-30 (0,77-0,79 d), C-34 (0,87 t), CH₂, C-16, C-18, C-19, C-32, C-33, CH, C-17, C-20); 2,56 t (2H, CH₂, C-31); 4,76-4,84 m (1H, CH, C-15); 7,16 m (14H, sAr-H, C-2, C-3, C-5, C-6, Ar-H, C-8 bis

C-12, C-23 bis C-27)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 13,9 (C-34); 21,7 (C-30); 22,4 (C-33); 25,8 (C-17); 26,8 (C-19); 26,9 (C-28, C-29); 31,3 (C-28, C-29); 33,5 (C-32); 34,4 (C-18); 35,2 (C-31); 39,6 (C-21); 41,0 (C-16); 50,1 (C-20); 78,1 (C-15); 80,8 (C-13); 125,2 (C-25); 125,3 (C-23, C-27); 127,2 (C-2, C-6); 127,2 (C-8, C-12); 127,6 (C-10); 127,8 (C-3, C-5); 128,0 (C-24, C-26); 128,1 (C-9, C-11); 139,2 (C-1); 142,1 (C-4); 142,6 (C-7); 151,1 (C-22); 172,2 (C-14)

MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 498 (1), 239 (100), 214 (6), 161 (35), 119 (71), 105 (48), 91 (32), 77 (32)

(-)-8-Phenylmenthyl (S)-4-butoxybenzilat, 33

C₃₄H₄₂O₄

M_r: 514,70 g/mol

Aufarbeitung: Variante A

Reinigung: Säulenchromatographie: n-Hexan/Ethylacetat 9:1

Ausbeute: 72 % d. Th.

DC: FM I: R_f = 0,64

Detektion: A, C (braun)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 0,76-2,00 m (24H, CH₃, C-28, C-29 (0,91 s und 1,01 s), C-30 (0,76-0,79 d), C-34 (0,91 t), CH₂, C-16, C-18, C-19, C-32, C-33, CH, C-17, C-20); 3,92 t (2H, CH₂, C-31); 4,80 m (1H, CH, C-15); 6,80-6,83 d (2H, sAr-H, C-3, C-5); 7,05 m (14H, sAr-H, C-2, C-6, Ar-H, C-8 bis C-12, C-23 bis C-27)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 13,9 (C-34); 19,3 (C-33); 21,7 (C-30); 25,7 (C-17); 26,9 (C-19); 27,0 (C-28, C-29); 31,3 (C-32); 31,3 (C-28, C-29); 34,4 (C-18); 39,6 (C-21); 40,9 (C-16); 50,1 (C-20); 67,7 (C-31); 78,1 (C-15); 80,6 (C-13); 113,7 (C-3, C-5); 125,2 (C-25); 125,3 (C-23, C-27); 127,2 (C-8, C-12); 127,7 (C-10); 127,9 (C-2, C-6); 128,1 (C-24, C-26); 128,6 (C-9, C-11); 133,8 (C-1); 142,3 (C-7); 151,2 (C-22); 158,8 (C-4); 172,3 (C-14)

MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 514 (1), 255 (100), 199 (9), 177 (4), 121 (27), 119 (21), 105 (21), 91 (9), 77 (6)

(-)-8-Phenylmenthyl (S)-4-dimethylaminobenzilat, 34

C₃₂H₃₉NO₃

M_r: 485,7 g/mol

Aufarbeitung: Variante B

Reinigung: Säulenchromatographie: n-Hexan/Ethylacetat 9:1

Ausbeute: 86 % d. Th.

DC: FM I: R_f = 0,47; FM II: R_f = 0,92

Detektion: A, C (gelbbraun)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 0,76-2,00 m (17H, CH₃, C-28, C-29 (0,89 s und 1,01 s), C-30 (0,76-0,79 d), CH₂, C-16, C-18, C-19, CH, C-17,

C-20); 2,92 s (6H, CH_3 , C-31, C-32); 4,80 m (1H, CH , C-15); 6,65-66,8 d (2H, sAr- H , C-3, C-5); 7,16 m (12H, sAr- H , C-2, C-6, Ar- H , C-8 bis C-12, C-23 bis C-27)

^{13}C -NMR: δ_{C} [ppm] (75 MHz, CDCl_3 , TMS): 21,7 (C-30); 26,2 (C-17); 26,5 (C-28, C-29); 26,9 (C-17); 31,3 (C-28, C-29); 34,4 (C-18); 39,6 (C-21); 40,6 (C-31, C-32); 41,0 (C-16); 50,1 (C-20); 78,0 (C-15); 80,6 (C-13); 111,9 (C-3, C-5); 125,1 (C-25); 125,4 (C-23, C-27); 127, 3 (C-8, C-12); 127,5 (C-10); 127,8 (C-2, C-6); 128,1 (C-24, C-26); 128,2 (C-9, C-11); 142,4 (C-7); 151,1 (C-22); 172,6 (C-14)

MS: m/z ($I_{\text{rel.}}$ [%]): M^+ 485 (2), 226 (100), 148 (15), 119 (20), 105 (85), 91 (21), 77 (20)

(-)-8-Phenylmenthyl (S)-4-trifluormethoxybenzilat, 35

$\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{F}_3\text{O}_4$

M_r : 526,59 g/mol

Aufarbeitung: Variante A

Reinigung: Säulenchromatographie: n-Hexan/Ethylacetat 9,5:0,5

Ausbeute: 52 % d. Th.

DC: FM I: R_f = 0,72

Detektion: A, C (gelbbraun)

^1H -NMR: δ_{H} [ppm] (300 MHz, CDCl_3 , TMS): 0,71-1,62 m (15H, CH_3 , C-30 (0,75-0,77 d), CH_3 , C-28, C-29 (0,96 s und 1,00 s), CH_2 , C-16, C-18, C-19, CH , C-17); 1,85 m (1H, CH_2 , C-16); 2,00 m (1H, CH , C-20); 4,80 m (1H, CH , C-15); 7,00-7,43 m (14H, sAr- H , C-2, C-3, C-5, C-6, Ar- H , C-8 bis C-12, C-23 bis C-27)

^{13}C -NMR: δ_{C} [ppm] (75 MHz, CDCl_3 , TMS): 21,6 (C-30), 25,0 (C-28,29); 26,7 (C-19); 27,7 (C-28,29); 31,3 (C-17); 34,4 (C-18); 39,5 (C-21), 40,9 (C-16); 49,9 (C-20); 78,3 (C-15); 80,3 (C-13); 118,7 (C-31); 120,1 (C-3, C-5); 125,1 (C-23, C27); 125,3 (C-25); 126,9 (C-8, C-12); 128,0 (C-10, C-24, C26); 128,1 (C-9, C11); 129,0 (C-2, C-6); 140,4 (C-1); 141,7 (C-7); 148,8 (C-4); 151,21 (C-22); 171,5 (C-14)

MS: m/z ($I_{\text{rel.}}$ [%]): M^+ 526 (1), 312 (1), 267 (100), 215 (2), 189 (26), 138 (22), 119 (42), 105 (36), 91 (16), 77 (7)

(-)-8-Phenylmenthyl (S)-4-trifluormethylbenzilat, 36

$\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{F}_3\text{O}_3$

M_r : 510,59 g/mol

Aufarbeitung: Variante A

Reinigung: Säulenchromatographie: n-Hexan/Ethylacetat 9:1

Ausbeute: 65 % d. Th.

DC: FM I: 0,68

Detektion: A, C (grau-braun)

^1H -NMR: δ_{H} [ppm] (300 MHz, CDCl_3 , TMS): 0,77-1,85 m (16H, CH_3 , C-28, C-29 (0,98 s und 1,02 s), C-30 (0,77-0,80 d), CH_2 , C-16, C-18, C-19, CH , C-

17); 2,05 m (1H, CH, C-20); 4,81 m (1H, CH, C-15); 7,04-7,22 m (10H, Ar-H, C-8 bis C-12, C-23 bis C-27); 7,50-7,57 m (4H, sAr-H, C-2, C-3, C-5, C-6)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 21,7 (C-30); 24,9 (C-28, C-29); 26,7 (C-19); 27,9 (C-17); 31,3 (C-28, C-29); 34,4 (C-18); 39,5 (C-21), 40,9 (C-16); 49,8 (C-20); 78,4 (C-15); 80,5 (C-13); 124,8 (C-3, C-5); 125,1 (C-23, C-27); 125,3 (C-25); 126,8 (C-8, C-12); 127,8 (C-2, C-6); 128,1 (C-10); 128,2 (C-24, C-26, C-9, C-11); 129,8 (C-4); 141,5 (C-7); 145,6 (C-1); 151,3 (C-22); 171,3 (C-14)

MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 510 (1), 251 (21), 173 (27), 138 (22), 119 (100), 105 (93), 91 (45), 77 (15)

(-)-8-Phenylmenthyl (S)-3,5-dimethoxybenzilat, 37

C₃₂H₃₈O₅

M_r: 502,64 g/mol

Aufarbeitung: Variante A

Reinigung: Säulenchromatographie: n-Hexan/Ethylacetat 9:1

Ausbeute: 82 % d. Th.

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 0,77-2,05 m (17H, CH₃, C-28, C-29, C-30, CH₂, C-16, C-18, C-19; CH, C-17, C-20); 3,71 (6H, CH₃, C-31, C-32); 4,80 m (1H, CH, C-15); 6,26-7,39 m (13H, sAr-H, C-2, C-4, C-6, Ar-H, C-8 bis C-12, C-23 bis C-27)

MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 502 (2), 243 (83), 165 (10), 119 (68), 105 (100), 91 (28), 77 (17)

(-)-8-Phenylmenthyl (S)-3-methoxybenzilat, 38

C₃₁H₃₆O₄

M_r: 472,6 g/mol

Aufarbeitung: Variante A

Reinigung: Säulenchromatographie: n-Hexan/Ethylacetat 9:1

Ausbeute: 74 % d. Th.

DC: FM I: 0,54

Detektion: A, C (blau)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 0,77-2,04 m (17H, CH₃, C-28, C-29 (0,90 s und 1,00 s), C-30 (0,77-0,79 d), CH₂, C-16, C-18, C-19; CH, C-17, C-20); 3,74 (3H, CH₃, C-31); 4,81 m (1H, CH, C-15); 6,79-6,80 d (1H, sAr-H, C-4); 6,98-7,34 m (13H, sAr-H, C-2, C-5, C-6, Ar-H, C-8 bis C-12, C-23 bis C-27)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 21,7 (C-30); 25,7 (C-28,29); 26,9 (C-19); 27,0 (C-17); 31,4 (C-28, C-29); 34,4 (C-18); 39,6 (C-21), 41,0 (C-16); 50,1 (C-20); 55,3 (C-31); 78,3 (C-15); 80,8 (C-13); 112,9 (C-2); 113,4 (C-4); 119,7 (C-6); 125,2 (C-25); 125,3 (C-23, C-27); 127,2 (C-8, C-12); 127,9 (C-24, C-26); 128,1 (C-9, C-11); 128,5 (C-10); 128,9 (C-5); 141,8 (C-7); 143,4 (C-1); 151,1 (C-22); 159,4 (C-3); 172,4 (C-14)

MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 472 (1), 213 (89), 138 (7), 135 (9), 119 (31), 105 (100), 91 (25), 77 (21)

(-)-8-Phenylmenthyl (S)-4-methylsulfonylbenzilat, 39

C₃₁H₃₆O₅S

M_r: 520,68 g/mol

Aufarbeitung: Variante A

Reinigung: Säulenchromatographie: n-Hexan/Ethylacetat 2:8

Ausbeute: 86 % d. Th.

DC: FM I: R_f = 0,20

Detektion: A, C (braun)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 0,73-1,71 m (15H, CH₃, C-30 (0,78-0,80 d), CH₃, C-28,C-29 (1,00 s und 1,02 s), CH₂, C-16, C-18, C-19, CH, C-17); 1,85 m (1H, CH₂, C-16); 2,06 m (1H, CH, C-20); 3,01 s (3H, CH₃, C-31); 4,84 m (1H, CH, C-15); 7,05 m (5H, ArH, C-23 bis 27); 7,20 m (5H, ArH, C-8 bis C-12); 7,58-7,61 d (2H, sArH, C-2, C-6); 7,84-7,86 d (2H, sArH, C-3, C-5)

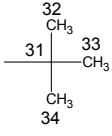
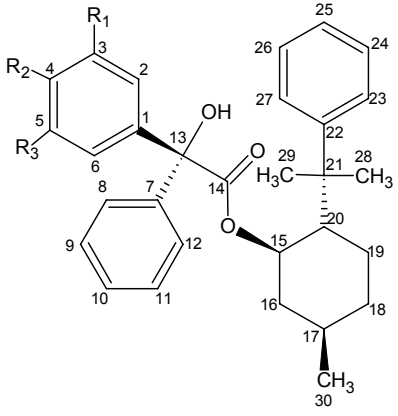

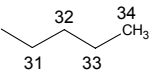
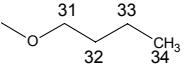

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 21,7 (C-30); 24,7 (C-28,29); 26,6 (C-19); 28,1 (C-28,29); 31,3 (C-17); 34,3 (C-18); 39,5 (C-21), 40,9 (C-16); 44,5 (C-31); 49,7 (C-20); 78,6 (C-15); 80,4 (C-13); 125,1 (C-23, C-27); 125,4 (C-25); 126,6 (C-8, C-12); 126,9 (C-3, C-5); 128,2 (C-9, C-11, C-24, C-26); 128,5 (C-2, C-6); 128,5 (C-10); 139,8 (C-1); 141,2 (C-7); 147,8 (C-4); 151,3 (C-22); 170,9 (C-14)

MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 520 (0,5), 261 (17), 215 (5), 183 (20), 139 (20), 119 (94), 105 (100), 91 (50), 77 (34)

Methode B (R-konfigurierte Benzilate). (-)-8-Phenylmenthyl (R)-4-*tert*-butylbenzilat (**40**), (-)-8-Phenylmenthyl (R)-4-methylmercaptobenzilat (**41**), (-)-8-Phenylmenthyl (R)-4-n-butylbenzilat (**42**), (-)-8-Phenylmenthyl (R)-4-butoxybenzilat (**43**): Eine Lösung von 2,8 mmol substituiertem (-)-8-Phenylmenthyl phenylglyoxylat in 15 ml Tetrahydrofuran wird in einer Trockeneis/Aceton-Mischung auf -78°C gekühlt. Über einen Zeitraum von 5-10 min werden 5,6 mmol einer 2,5 M Lösung von Phenylmagnesiumbromid in Tetrahydrofuran zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird für 2 h bei -78°C gerührt, anschließend auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Die Lösung wird mit 40 ml 10 %iger Ammoniumchlorid-Lösung versetzt und dann zweimal mit Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen werden vereint, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Die Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie [6].

(-)-8-Phenylmenthyl (R)-4-methylsulfonylbenzilat (**44**): Das R-konfigurierte 4-Methylsulfonylbenzilat (**44**) wird analog zur S-konfigurierten Verbindung (**39**) durch Oxidation von (-)-8-Phenylmenthyl (R)-4-methylmercaptobenzilat (**41**) mit 3-Chlorperbenzoesäure in Dichlormethan erhalten.

Tab. 29: Bezifferung der *R*-konfigurierten* (-)-8-Phenylmenthyl benzilate

Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	Formel
40	H		H	
41	H		H	
42	H		H	
43	H		H	
44	H		H	

* die absolute Konfiguration bezieht sich auf das asymmetrische C-Atom im Benzilsäurerest

(-)-8-Phenylmenthyl (*R*)-4-*tert*-butylbenzilat, 40

C₃₄H₄₂O₃

M_r: 498,70 g/mol

Reinigung: Säulenchromatographie, n-Hexan/Ethylacetat 9,5:0,5

Ausbeute: 78 % d. Th.

DC: FM I: R_f = 0,74

Detektion: A, C (himbeerrot)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 0,70-1,54 m (24H, CH₃, C-30 (0,77-0,79 d), CH₃, C-28, C-29 (0,86 s und 0,99 s), CH₃, C-32 bis C-34 (1,17 s), CH₂, C-16, C-18, C-19, CH, C-17); 1,93 m (2H, CH₂, C-16; CH, C-20), 4,78 m (1H, CH, C-15); 7,03-7,45 m (14H, sAr-H, C-2, C-3, C-5, C-6, Ar-H, C-8 bis C-12, C-23 bis C-27)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 21,7 (30); 26,2 (C-28,29); 26,5 (C-28,29); 27,0 (C-19); 31,3 (C-32 bis C-34); 34,4 (C-18); 39,6 (C-21), 41,0 (C-16); 50,2 (C-20); 78,3 (C-15); 80,7 (C-13); 124,8 (C-3, C-5); 125,2 (C-25); 125,3 (C-23, C-27); 126,9 (C-8, C-12); 127,3 (C-2, C-6); 127,8 (C-10); 127,9 (C-24, C-26); 128,1 (C-9, C-11); 139,0 (C-1); 141,8 (C-7); 151,0 (C-4, C-22); 172,4 (C-14)

(-)-8-Phenylmenthyl (*R*)-4-methylmercaptobenzilat, 41

C₃₁H₃₆O₃S

M_r: 488,68 g/mol

Reinigung: Säulenchromatographie, n-Hexan/Ethylacetat 9:1

Ausbeute: 79 % d. Th.

DC: FM I: $R_f = 0,57$
 Detektion: A, C (rosa)

$^1\text{H-NMR}$: δ_{H} [ppm] (300 MHz, CDCl_3 , TMS): 0,71-1,57 m (15H, CH_3 , C-30 (0,77-0,79 d), CH_3 , C-28, C-29 (0,96 s und 1,02 s), CH_2 , C-16, C-18, C-19, CH , C-17); 1,97 m (2H, CH_2 , C-16; CH , C-20); 2,34 s (3H, S- CH_3 , C-31); 4,75-4,84 m (1H, CH , C-15); 7,22 m (14H, sAr- H , C-2, C-3, C-5, C-6, Ar- H , C-8 bis C-12, C-23 bis C-27)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ_{C} [ppm] (75 MHz, CDCl_3 , TMS): 15,6 (C-31); 21,7 (30); 25,2 (C-28,29); 26,8 (19); 27,5 (C-17); 31,3 (C-28,29); 34,4 (18); 39,5 (21), 40,9 (16); 50,0 (20); 78,2 (15); 80,6 (13); 125,2 (C-23, C-25, C-27); 125,9 (C-3, C-5); 127,2 (C-8, C-12); 127,6 (C-2, C-6, C-10); 128,0 (C-24, C-26); 128,1 (C-9, C-11); 138,0 (C-4); 139,0 (C-1); 141,8 (C-7); 151,3 (C-22); 171,8 (C-14)

(-)-8-Phenylmenthyl (R)-4-n-butylbenzilat, 42

$\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{O}_3$

M_r : 498,70 g/mol

Reinigung: Säulenchromatographie, n-Hexan/Ethylacetat 9,5:0,5

Ausbeute: 67 % d. Th.

DC: FM I: $R_f = 0,86$
 Detektion: A, C (weinrot)

$^1\text{H-NMR}$: δ_{H} [ppm] (300 MHz, CDCl_3 , TMS): 0,77-2,02 m (24H, CH_3 , C-28, C-29 (0,90 s und 1,01 s), C-30 (0,77-0,79 d), C-34 (0,87 t); CH_2 , C-16, C-18, C-19, C-32, C-33; CH , C-17, C-20); 2,46 t (2H, CH_2 , C-31); 4,76-4,84 m (1H, CH , C-15); 7,16 m (14H, sAr- H , C-2, C-3, C-5, C-6, Ar- H , C-8 bis C-12, C-23 bis C-27)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ_{C} [ppm] (75 MHz, CDCl_3 , TMS): 13,9 (C-34); 21,7 (C-30); 22,3 (C-33); 25,9 (C-17); 26,8 (C-19); 26,9 (C-28, C-29); 31,3 (C-28, C-29); 33,4 (C-32); 34,4 (C-18); 35,2 (C-31); 39,6 (C-21), 41,0 (C-16); 50,1 (C-20); 78,1 (C-15); 80,8 (C-13); 125,2 (C-25); 125,3 (C-23, C-27); 127,1 (C-2, C-6); 127,3 (C-8, C-12); 127,8 (C-10); 127,9 (C-3, C-5); 128,0 (C-24, C-26); 128,1 (C-9, C-11); 139,3 (C-1); 142,0 (C-4); 142,5 (C-7); 151,1 (C-22); 172,3 (C-14)

(-)-8-Phenylmenthyl (R)-4-butoxybenzilat, 43

$\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{O}_4$

M_r : 514,70 g/mol

Reinigung: Säulenchromatographie, n-Hexan/Ethylacetat 9:1

Ausbeute: 81 % d. Th.

DC: FM I: $R_f = 0,64$
 Detektion: A, C (braun)

$^1\text{H-NMR}$: δ_{H} [ppm] (300 MHz, CDCl_3 , TMS): 0,76-2,00 m (24H, CH_3 , C-28, C-29 (0,95 s und 1,02 s), C-30 (0,77-0,79 d), C-34 (0,86 t); CH_2 , C-16, C-18, C-19, C-32, C-33; CH , C-17, C-20); 3,82 t (2H, CH_2 , C-31); 4,80 m (1H, CH , C-15); 6,68-6,71 d (2H, sAr- H , C-3, C-5); 7,05 m (12H, sAr- H , C-2, C-6, Ar- H , C-8 bis C-12, C-23 bis C-27)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 13,8 (C-34); 19,2 (C-33); 21,7 (C-30); 25,7 (C-17); 26,9 (C-19); 27,1 (C-28, C-29); 31,2 (C-32); 31,3 (C-28, C-29); 34,4 (C-18); 39,6 (C-21); 41,0 (C-16); 50,1 (C-20); 67,6 (C-31); 78,1 (C-15); 80,6 (C-13); 113,8 (C-3, C-5); 125,2 (C-25); 125,3 (C-23, C-27); 127,3 (C-8, C-12); 127,8 (C-10); 127,9 (C-2, C-6); 128,1 (C-24, C-26); 128,4 (C-9, C-11); 134,1 (C-1); 142,1 (C-7); 151,2 (C-22); 158,7 (C-4); 172,3 (C-14)

(-)-8-Phenylmenthyl (*R*)-4-methylsulfonylbenzilat, 44

C₃₁H₃₆O₅S

M_r: 520,68 g/mol

Reinigung: Säulenchromatographie, n-Hexan/Ethylacetat 2:8

Ausbeute: 86 % d. Th.

DC: FM I: R_f = 0,20

Detektion: A, C (braun)

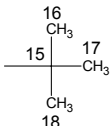
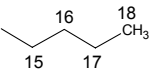
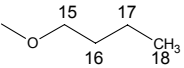
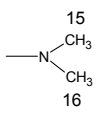
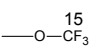





¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 0,73-1,71 m (15H, CH₃, C-30 (0,79-0,81 d), CH₃, C-28, C-29 (0,95 s und 1,01 s), CH₂, C-16, C-18, C-19, CH, C-17); 1,85 m (1H, CH₂, C-16); 2,09 m (1H, CH, C-20); 2,91 s (3H, CH₃, C-31); 4,80 m (1H, CH, C-15); 6,98 m (5H, ArH, C-23 bis 27); 7,32 m (5H, ArH, C-8 bis C-12); 7,49-7,52 d (2H, sArH, C-2, C-6); 7,73-7,76 d (2H, sArH, C-3, C-5)

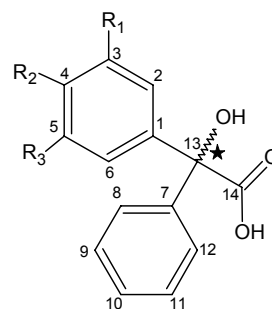
¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 21,7 (C-30); 23,9 (C-28,29); 26,6 (C-19); 28,5 (C-28,29); 31,3 (C-17); 34,4 (C-18); 39,3 (C-21); 40,9 (C-16); 44,6 (C-31); 49,9 (C-20); 78,5 (C-15); 80,5 (C-13); 125,1 (C-23, C-27); 125,2 (C-25); 126,9 (C-8, C-12); 127,0 (C-3, C-5); 128,2 (C-9, C-11, C-24, C-26); 128,3 (C-2, C-6); 128,4 (C-10); 139,6 (C-1); 141,4 (C-7); 148,0 (C-4); 151,4 (C-22); 170,7 (C-14)

4.3.1.4 Darstellung der substituierten (*R*)-/(*S*)-Benzilsäure

(*R*)-/(*S*)-4-*tert*-Butylbenzilsäure (**45**), (*R*)-/(*S*)-4-*n*-Butylbenzilsäure (**46**), (*R*)-/(*S*)-4-Butoxybenzilsäure (**47**), (*R*)-/(*S*)-4-Dimethylaminobenzilsäure (**48**), (*S*)-4-Trifluormethoxybenzilsäure (**49**), (*S*)-4-Trifluormethylbenzilsäure (**50**), (*S*)-3,5-Dimethoxybenzilsäure (**51**), (*S*)-3-Methoxybenzilsäure (**52**), (*R*)-/(*S*)-4-Methylsulfonylbenzilsäure (**53**): 2 mmol (-)-8-Phenylmenthyl (*R*)- oder (*S*)-benzilat werden in Ethanol/Wasser (5:1) gelöst. 10 mmol einer 45 %igen Kaliumhydroxid-Lösung werden zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 3 (**48** bis **52**) bzw. 15 h (**45**, **46**) bei 65°C erhitzt. Anschließend wird die Lösung am Rotationsverdampfer konzentriert und mit 1 N Natriumhydroxid-Lösung verdünnt. Nicht verseifbare Bestandteile werden mit Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wird mit konzentrierter Salzsäure angesäuert und mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wird über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt [6].

Tab. 30: Bezifferung der (*R*)-/(*S*)-Benzilsäure

Nr.*	R ₁	R ₂	R ₃	Formel
45	H		H	
46	H		H	
47	H		H	
48	H		H	
49	H		H	
50	H		H	
51		H		
52		H	H	
53	H		H	



* der *R*- und *S*-konfigurierten Benzilsäure wurde jeweils die gleiche Verbindungs-Nr. zugewiesen

Die Strukturen der enantiomeren Benzilsäuren wurden lediglich mit achiralen analytischen Methoden gesichert. Eine Differenzierung der einzelnen Enantiomere ist an dieser Stelle nicht erfolgt, so dass dem *R*- und *S*-Enantiomer die gleiche Verbindungs-Nr. zugewiesen wurde.

(*R*)-/(*S*)-4-*tert*-Butylbenzilsäure, 45

C₁₈H₂₀O₃

M_r: 284,35 g/mol

Ausbeute: 66 % d. Th. (Reaktionszeit 15 h)

DC: FM II: R_f = 0,28

Detektion: A, C (pink)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, DMSO-d₆, TMS): 1,25 s (9H, CH₃, C-16 bis C-18); 7,25-7,39 m (9H, Ar-H, C-8 bis C-12, sAr-H, C-2, C-3, C-5, C-6)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, DMSO-d₆, TMS): 31,3 (C-16 bis C-18); 34,4 (C-15); 80,2 (C-13); 124,6 (C-2, C-6); 127,0 (C-8, C-12); 127,3 (C-3, C-5); 127,3 (C-10); 127,8 (C-9, C-11); 141,0 (C-1); 144,0 (C-7); 149,7 (C-4); 175,0 (C-14)
MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 284 (0,5), 238 (39), 161 (68), 105 (59), 77 (44)

(R)-/(S)-4-n-Butylbenzilsäure, 46

C₁₈H₂₀O₃

M_r: 284,35 g/mol

Ausbeute: 67 % d. Th. (Reaktionszeit 15 h)

DC: FM II: R_f = 0,39

Detektion: A, C (weinrot)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 0,85 t (3H, CH₃, C-18); 1,28 m (2H, CH₂, C-17); 1,52 m (2H, CH₂, C-16); 2,54 t (2H, CH₂, C-15); 7,08-7,44 m (9H, sAr-H, C-2, C-3, C-5, C-6; Ar-H, C-8 bis C-12)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 13,9 (C-18); 22,4 (C-17); 33,4 (C-16); 35,3 (C-15); 80,9 (C-13); 127,2 (C-2, C-6); 127,3 (C-8, C-12); 128,2 (C-3, C-5); 128,4 (C-10, C-9, C-11); 138,4 (C-1); 141,1 (C-7); 143,3 (C-4); 173,8 (C-14)

MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 284 (1), 239 (100), 161 (56), 105 (95), 77 (32)

(R)-/(S)-4-Butoxybenzilsäure, 47

C₁₈H₂₀O₄

M_r: 300,35 g/mol

Ausbeute: 79 % d. Th. (Reaktionszeit 3 h, 100°C)

F_p: 86-88°C ((Petroleumether), (85-86°C [123]))

DC: FM II: R_f = 0,59

Detektion: A, C (rotbraun)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 0,90 t (3H, CH₃, C-18); 1,41 m (2H, CH₂, C-17); 1,69 m (2H, CH₂, C-16); 3,88 t (2H, CH₂, C-15); 6,77-6,80 d (2H, sAr-H, C-3, C-5); 7,08-7,44 m (7H, sAr-H, C-2, C-6; Ar-H, C-8 bis C-12)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 13,8 (C-18); 19,2 (C-17); 31,2 (C-16); 67,7 (C-15); 80,8 (C-13); 114,1 (C-3, C-5); 127,3 (C-8, C-12); 128,2 (C-2, C-6); 128,3 (C-10); 128,6 (C-9, C-11); 133,0 (C-1); 141,3 (C-7); 159,1 (C-4); 177,4 (C-14)

MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 300 (1), 121 (50), 119 (100), 105 (11), 77 (11)

(R)-/(S)-4-Dimethylaminobenzilsäure, 48

C₁₆H₁₇NO₃

M_r: 271,31 g/mol

Aufarbeitung: [124]

Ausbeute: 56 % d. Th. (Reaktionszeit 3 h)
 F_p: 50-52°C (Diethylether), (50-55°C [124])
 DC: FM II: R_f = 0,38
 Detektion: A, C (rot), D (orange)
¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 3,01 s (6H, CH₃, C-15, C-16); 4,02 (1H, OH); 6,62 d (2H, sAr-H, C-3, C-5); 7,25 m (7H, Ar-H, C-8 bis C-12, sAr-H, C-2, C-6)
¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 40,4 (C-15, C-16); 78,8 (C-13); 110,5 (C-3,5); 128,0 (C-2, C-6); 129,5 (C-8, C-12); 131,13 (C-10), 132,8 (C-9, C-11); 141,6 (C-7); 153,3 (C-4); 176,3 (C-14)
 MS: m/z (I_{rel.} [%]): kein M⁺, 225 (29), 148 (100), 105 (42), 77 (68)

(S)-4-Trifluormethoxybenzilsäure, 49

C₁₅H₁₁F₃O₄

M_r: 312,24 g/mol
 Ausbeute: 87% (Reaktionszeit 3 h)
 DC: FM II: R_f = 0,44
 Detektion: A, C (rot)
¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 7,09-7,12 d (2H, sAr-H, C-3, C-5); 7,29-7,39 m (5H, Ar-H, C-8 bis C-12); 7,43-7,46 d (2H, sAr-H, C-2, C-6)
¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 80,5 (C-13); 118,7 (C-15); 120,4 (C-3, C-5); 127,1 (C-8, C-12); 128,4 (C-9, C-11); 128,6 (C-10); 129,1 (C-2,6); 139,6 (C-1); 140,9 (C-7); 149,1 (C-4); 177,7 (C-14).
¹⁹F-NMR: δ_F [ppm] (282 MHz, CDCl₃, TMS): -58,05
 MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 312 (01), 267 (100), 189 (88), 161 (9), 105 (48), 77 (31)

(S)-4-Trifluormethylbenzilsäure, 50

C₁₅H₁₁F₃O₃

M_r: 296,24 g/mol
 Ausbeute: 52 % (Reaktionszeit 3 h)
 DC: FM II: R_f = 0,39
 Detektion: A, C (himbeerrot)
¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 7,20-7,35 m (5H, Ar-H, C-8 bis C-12); 7,50-7,57 m (4H, sAr-H, C-2, C-3, C-5, C-6)
¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 80,7 (C-13); 125,0 (C-3, C-5); 127,1 (C-9, C-11); 127,9 (C-2, C-6); 128,5 (C-8, C-12); 128,6 (C-10); 130,6 (C-4); 140,9 (C-7); 144,9 (C-1); 177,3 (C-14)
¹⁹F-NMR: δ_F [ppm] (282 MHz, DMSO-d₆, TMS): -61,07
 MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 296 (0), 251 (37), 173 (100), 105 (68), 95 (11), 78 (11), 77 (71)

(S)-3,5-Dimethoxybenzilsäure, 51

C₁₆H₁₆O₅

M_r: 288,29 g/mol

Ausbeute: 56 % (Reaktionszeit 3 h)

DC: FM II: R_f = 0,40

Detektion: A, C (blau)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 3,68 s (6H, OCH₃ an C-3, C-5); 6,37 s (1H, sAr-H, C-4); 6,61 s (2H, sAr-H, C-2, C-6); 7,26-7,28 m (3H, Ar-H, C-9 bis C-11); 7,39-7,42 m (2H, Ar-H, C-8, C-12)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 55,4 (OCH₃ an C-3, C-5); 81,0 (C-13); 100,2 (C-4); 105,7 (C-2, C-6); 127,3 (C-8, C-12); 128,4 (C-9, C-11); 130,2 (C-10); 141,0 (C-7); 143,3 (C-1); 160,6 (C-3, C-5); 177,6 (C-14)

MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 288 (3), 243 (11), 105 (100), 77 (45)

(S)-3-Methoxybenzilsäure, 52

C₁₅H₁₄O₅

M_r: 258,26 g/mol

Ausbeute: 77 % (Reaktionszeit 3 h)

DC: FM II: R_f = 0,30

Detektion: A, C (blau)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 3,67 s (3H, CH₃, C-15); 6,77-6,81 m (1H, sAr-H, C-4); 6,96-6,98 m (2H, sAr-H, C-2, C-6); 7,15-7,27 m (4H, sAr-H, C-5, Ar-H, C-9 bis C-11); 7,35-7,39 m (2H, Ar-H, C-8, C-12)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 55,7 (OCH₃); 81,4 (C-13); 113,7 (C-2); 114,1 (C-4); 120,2 (C-6); 127,7 (C-8, C-12); 128,5 (C-9, C-11); 128,6 (C-10); 129,6 (C-5); 141,6 (C-7); 143,1 (C-1); 159,8 (C-3); 178,1 (C-14)

MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 258 (2), 213 (29), 135 (10), 105 (100), 77 (62)

(R)-/(S)-4-Methylsulfonylbenzilsäure, 53

C₁₅H₁₄O₅S

M_r: 306,36 g/mol

Ausbeute: 63 % (Reaktionszeit 3 h)

DC: FM II: R_f = 0,25

Detektion: A, C (rosa)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 2,96 s (3H, CH₃, C-15); 6,53 s (2H, OH, COOH) 7,28-7,31 m (5H, Ar-H, C-8 bis C-12); 7,61-7,64 d (2H, sAr-H, C-2, C-6); 7,77-7,80 d (2H, sAr-H, C-3, C-5)

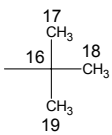
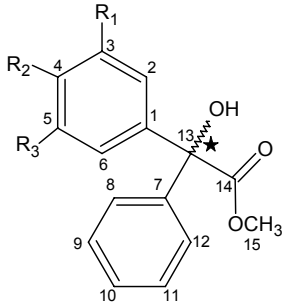
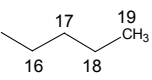
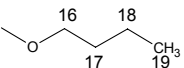
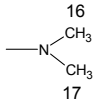
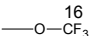

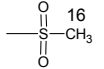
¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 44,4 (C-15); 80,6 (C-13); 127,0 (C-8, C-12); 127,1 (C-3, C-5); 128,6 (C-2, C-6, C-9, C-11); 128,8 (C-10); 139,8 (C-1); 140,7 (C-7); 147,4 (C-4); 176,0 (C-14)

MS: m/z (I_{rel.} [%]): kein M⁺, 261 (12), 183 (22), 105 (100), 91 (50), 77 (46)

4.3.1.5 Darstellung der (*R*)- und (*S*)-Methyl benzilate

(*R*)-/(*S*)-Methyl 4-*tert*-butylbenzilat (**54**), (*R*)-/(*S*)-Methyl 4-*n*-butylbenzilat (**55**), (*R*)-/(*S*)-Methyl 4-butoxybenzilat (**56**), (*S*)-Methyl 4-dimethylaminobenzilat (**57**), (*S*)-Methyl 4-trifluormethoxybenzilat (**58**), (*S*)-Methyl 4-trifluormethylbenzilat (**59**), (*S*)-Methyl 3,5-dimethoxybenzilat (**60**), (*S*)-Methyl 3-methoxybenzilat (**61**), (*R*)-/(*S*)-Methyl 4-methylsulfonylbenzilat (**62**): 1,5 mmol substituierte Benzilsäure und 3 mmol Natriumhydrogencarbonat werden in 5 ml Dimethylformamid suspendiert. Nach Zugabe von 2,5 mmol Dimethylsulfat wird die Mischung zunächst 10 min bei Raumtemperatur, sodann 10 min auf dem Wasserbad bei 80-90 °C gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch in 20 ml Wasser gegossen und nach dem Erkalten mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt [5].

Tab. 31: Bezifferung der (*R*)-/(*S*)-Methyl benzilate

Nr.*	R ₁	R ₂	R ₃	Formel
54	H		H	
55	H		H	
56	H		H	
57	H		H	
58	H		H	
59	H		H	
60	—OCH ₃ ¹⁶	H	—OCH ₃ ¹⁷	
61	—OCH ₃ ¹⁶	H	H	
62	H		H	

* die Verbindungs-Nr. steht für das *R*- oder das *S*-enantiomere Methyl benzilat

Die Strukturen der enantiomeren Methyl benzilate wurden lediglich mit achiralen analytischen Methoden gesichert. Eine Differenzierung der einzelnen Enantiomere ist an dieser Stelle nicht erfolgt, so dass dem *R*- und *S*-Enantiomer die gleiche Verbindungs-Nr. zugewiesen wurde. Im Folgenden wird bei der Analytik der enantiomeren Methyl benzilate auf das Racemat verwiesen.

(*R*)-/(*S*)-Methyl 4-*tert*-butylbenzilat, 54

$C_{19}H_{22}O_3$

M_r : 298,38 g/mol

Ausbeute: 81 % d. Th.

Analytik: DC, 1H -NMR, ^{13}C -NMR, MS (s. Racemat **63**)

(*R*)-/(*S*)-Methyl 4-*n*-butylbenzilat, 55

$C_{19}H_{22}O_3$

M_r : 298,38 g/mol

Ausbeute: 63 % d. Th.

Analytik: DC, 1H -NMR, ^{13}C -NMR, MS (s. Racemat **64**)

(*R*)-/(*S*)-Methyl 4-butoxybenzilat, 56

$C_{19}H_{22}O_4$

M_r : 314,38 g/mol

Ausbeute: 81 % d. Th.

Analytik: DC, 1H -NMR, ^{13}C -NMR, MS (s. Racemat **65**)

(*S*)-Methyl 4-dimethylaminobenzilat, 57

$C_{17}H_{19}O_3$

M_r : 285,34 g/mol

Reinigung: Säulenchromatographie, *n*-Hexan/Ethylacetat 8:2

Ausbeute: 63 % d. Th.

Analytik: DC, 1H -NMR, ^{13}C -NMR, MS (s. Racemat **66**)

(*S*)-Methyl 4-trifluormethoxybenzilat, 58

$C_{16}H_{13}F_3O_4$

M_r : 326,27 g/mol

Ausbeute: 68 % d. Th.

Analytik: DC, 1H -NMR, ^{13}C -NMR, MS (s. Racemat **67**)

(S)-Methyl 4-trifluormethylbenzilat, 59

$C_{16}H_{13}F_3O_3$

M_r : 310,26 g/mol

Ausbeute: 81 % d. Th.

Analytik: DC, 1H -NMR, ^{13}C -NMR, MS (s. Racemat **68**)

(S)-Methyl 3,5-dimethoxybenzilat, 60

$C_{17}H_{18}O_5$

M_r : 302,31 g/mol

Ausbeute: 90 % d. Th.

DC: FM II: $R_f = 0,95$

Detektion: A, C (blau)

1H -NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, $CDCl_3$, TMS): 3,63 s (6H, OCH_3 an C-3, C-5); 3,69 s (3H, CH_3 , C-15); 6,34 s (1H, sAr-H, C-4); 6,45 s (2H, sAr-H, C-2, C-6); 7,24-7,27 m (3H, Ar-H, C-9 bis C-11); 7,33-7,36 m (2H, Ar-H, C-8, C-12)

^{13}C -NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, $CDCl_3$, TMS): 54,0 (C-15); 55,8 (OCH_3 an C-3, C-5); 81,4 (C-13); 100,3 (C-4); 106,1 (C-2, C-6); 127,7 (C-8, C-12); 128,5 (C-9 bis C-11); 141,9 (C-7); 144,4 (C-1); 160,9 (C-3, C-5); 175,2 (C-14)

MS: m/z ($I_{rel.}$ [%]): M^+ 302 (3), 243 (18), 105 (100), 77 (41)

(S)-Methyl 3-methoxybenzilat, 61

$C_{16}H_{16}O_4$

M_r : 272,29 g/mol

Ausbeute: 87 % d. Th.

Analytik: DC, 1H -NMR, ^{13}C -NMR, MS (s. Racemat **69**)

HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm

Fließmittel: Methanol

Flussrate: 0,3 ml/min

Detektion: 281 nm

Retentionszeit: $t_S = 10,81$ min

(R)-/(S)-Methyl 4-methylsulfonylbenzilat, 62

$C_{16}H_{16}O_5S$

M_r : 320,36 g/mol

Ausbeute: 72 %

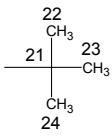
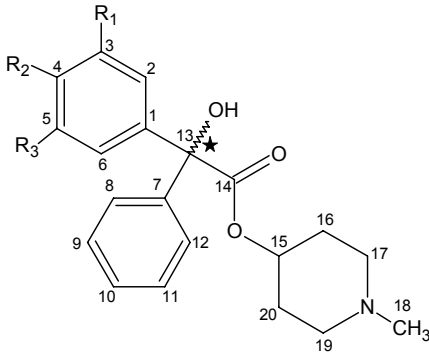
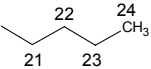
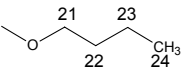
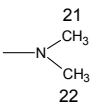






Analytik: DC, 1H -NMR, ^{13}C -NMR, MS (s. Racemat **71**)

4.3.1.6 Darstellung der enantiomeren Zielstrukturen: (*R*)-/(*S*)-N-Methyl-4-piperidyl benzilate

(*R*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-*tert*-butylbenzilat (**1**), (*S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-*tert*-butylbenzilat (**2**), (*R*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-*n*-butylbenzilat (**3**), (*S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-*n*-butylbenzilat (**4**), (*R*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-butoxybenzilat (**5**), (*S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-butoxybenzilat (**6**), (*S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-dimethylamino-benzilat (**8**), (*S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethoxybenzilat (**10**), (*S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethylbenzilat (**12**), (*S*)-N-Methyl-4-piperidyl 3,5-dimethoxybenzilat (**14**), (*S*)-N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (**16**), (*R*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-methylsulfonylbenzilat (**17**), (*S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-methylsulfonylbenzilat (**18**): 1 mmol substituiertes Methyl benzilat und 1,2 mmol N-Methyl-4-piperidinol werden in 20 ml Petroleumbenzin ($K_p = 60-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) vorgelegt. Zur Entfernung von Wasserspuren werden 5 ml Lösungsmittel abdestilliert. Anschließend wird 0,05 ml einer frisch bereiteten 10 %igen methanolischen Natriummethanolat-Lösung langsam zur Reaktionsmischung zugetropft und die Destillationsgeschwindigkeit so geregelt, dass innerhalb von 5 h das Petroleumbenzin sowie vorhandenes und entstehendes Methanol abgetrieben werden. Der Rückstand wird in Chloroform aufgenommen und dreimal mit 10 %iger Weinsäure extrahiert. Die sauren, wässrigen Phasen werden vereinigt, unter Rühren vorsichtig mit 4 M Natriumhydroxid-Lösung alkalisiert und sofort dreimal mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt [5].

(*R*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-dimethylaminobenzilat (**7**) und (*R*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethoxybenzilat (**9**) wurden durch Racemttrennung mittels HPLC (Kap. 4.4.4.3) erhalten. (*R*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethylbenzilat (**11**), (*R*)-N-Methyl-4-piperidyl 3,5-dimethoxybenzilat (**13**) und (*R*)-N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat, (**15**) konnten durch fraktionierte Kristallisation mit Weinsäurederivaten gewonnen werden (Kap. 4.3.3.1).

Tab. 32: Bezifferung der (*R*)-/(*S*)-N-Methyl-4-piperidyl benzilate

Nr.		R ₁	R ₂	R ₃	Formel
<i>R</i>	<i>S</i>				
1	2	H		H	
3	4	H		H	
5	6	H		H	
7	8	H		H	
9	10	H		H	
11	12	H		H	
13	14		H		
15	16		H	H	
17	18	H		H	

Die enantiomeren Zielstrukturen wurden vollständig analytisch charakterisiert. Im Folgenden wird bei den analytischen Methoden (DC, UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS), die keine Unterscheidung von Racemat und Enantiomer zulassen, auf das Racemat verwiesen.

(*R*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-*tert*-butylbenzilat, 1

C₂₄H₃₁NO₃

M_r: 381,51 g/mol

Ausbeute: 64 % d. Th. (Reaktionszeit 5 h)

F_p: 144 °C (Diethylether)

[α]_D²⁰: nicht messbar, zu kleiner Wert

CHN:	theor. [%]	C: 75,56	H: 8,19	N: 3,67	O: 12,58
	gef. [%]	C: 75,51	H: 8,21	N: 3,61	O: 12,67

Analytik: DC, UV, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, MS (s. Racemat **72**)
HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm
Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 67:33:0,1
Flussrate: 1 ml/min
Detektion: 230 nm
Retentionszeit: $t_R = 23,74$ min
ee: 98,4 %

(S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-*tert*-butylbenzilat, 2

$\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{NO}_3$

M_r : 381,51 g/mol
Ausbeute: 64 % (Reaktionszeit 5 h)
 F_p : 144 °C (Diethylether)
 $[\alpha]_D^{20}$: nicht messbar, zu kleiner Wert
CHN: theor. [%] C: 75,56 H: 8,19 N: 3,67 O: 12,58
gef. [%] C: 75,44 H: 8,28 N: 3,59 O: 12,69
Analytik: DC, UV, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, MS (s. Racemat **72**)
HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm
Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 67:33:0,1
Flussrate: 1 ml/min
Detektion: 230 nm
Retentionszeit: $t_S = 25,81$ min
ee: > 99 %

(R)-N-Methyl-4-piperidyl 4-*n*-butylbenzilat, 3

$\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{NO}_3$

M_r : 381,51 g/mol
Ausbeute: 74 % (Reaktionszeit 5 h)
 F_p : helles Öl
 $[\alpha]_D^{20}$: nicht messbar, zu kleiner Wert
Analytik: DC, UV, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, MS (s. Racemat **73**)
HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm
Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 24:76:0,1
Flussrate: 0,3 ml/min
Detektion: 230 nm
Retentionszeit: $t_R = 17,57$ min
ee: 96 %

(S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-n-butylbenzilat, 4 $C_{24}H_{31}NO_3$ M_r : 381,51 g/mol

Ausbeute: 74 % (Reaktionszeit 5 h)

 F_p : helles Öl $[\alpha]_D^{20}$: nicht messbar, zu kleiner WertAnalytik: DC, UV, 1H -NMR, ^{13}C -NMR, MS (s. Racemat **73**)

HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm

Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 24:76:0,1

Flussrate: 0,3 ml/min

Detektion: 230 nm

Retentionszeit: $t_s = 16,75$ min

ee: 96 %

(R)-N-Methyl-4-piperidyl 4-butoxybenzilat, 5 $C_{24}H_{31}NO_4$ M_r : 397,51 g/mol

Ausbeute: 67 % (Reaktionszeit 5 h)

 F_p : 85-86°C (Diethylether) $[\alpha]_D^{20}$: - 1,2° (c = 0,82; Methanol)

CHN: theor. [%] C: 72,52 H: 7,86 N: 3,52 O: 16,10

gef. [%] C: 72,32 H: 8,00 N: 3,52 O: 16,16

Analytik: DC, UV, 1H -NMR, ^{13}C -NMR, MS (s. Racemat **74**)

HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm

Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 95:5:0,1

Flussrate: 0,7 ml/min

Detektion: 230 nm

Retentionszeit: $t_R = 30,87$ min

ee: 94 %

(S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-butoxybenzilat, 6 $C_{24}H_{31}NO_4$ M_r : 397,51 g/mol

Ausbeute: 67 % (Reaktionszeit 5 h)

 F_p : 85-86°C (Diethylether) $[\alpha]_D^{20}$: + 1,2° (c = 1,1; Methanol)

CHN: theor. [%] C: 72,52 H: 7,86 N: 3,52 O: 16,10

gef. [%] C: 72,21 H: 8,00 N: 3,56 O: 16,23

Analytik: DC, UV, 1H -NMR, ^{13}C -NMR, MS (s. Racemat **74**)

HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm

Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 95:5:0,1
Flussrate: 0,7 ml/min
Detektion: 230 nm
Retentionszeit: $t_s = 29,49$ min
ee: 94,6 %

(R)-N-Methyl-4-piperidyl 4-dimethylaminobenzilat, 7

$C_{22}H_{28}N_2O_3$

M_r : 368,47 g/mol
Ausbeute: Racemattrennung mittels HPLC (Kap. 3.1.4.1)
 F_p : 120°C (Diethylether)
Analytik: DC, UV, 1H -NMR, ^{13}C -NMR, MS (s. Racemat **75**)
HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm
Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 85,5:14,5:0,1
Flussrate: 0,9 ml/min
Detektion: 281 nm
Retentionszeit: $t_R = 14,90$ min
ee: > 99 %

(S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-dimethylaminobenzilat, 8

$C_{22}H_{28}N_2O_3$

M_r : 368,5 g/mol
Ausbeute: 69 % (Reaktionszeit 5 h)
 F_p : 120°C (Diethylether)
Analytik: DC, UV, 1H -NMR, ^{13}C -NMR, MS (s. Racemat **75**)
HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm
Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 85,5:14,5:0,1
Flussrate: 0,9 ml/min
Detektion: 281 nm
Retentionszeit: $t_s = 15,87$ min
ee: 98 %

(R)-N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethoxybenzilat, 9

$C_{21}H_{22}F_3NO_4$

M_r : 409,40 g/mol
Ausbeute: Racemattrennung mittels HPLC (Kap. 3.1.4.1)
 F_p : 100°C (Diethylether)
 $[\alpha]_D^{20}$: - 8,3 (c = 0,84; Methanol)
Analytik: DC, UV, 1H -NMR, ^{13}C -NMR, ^{19}F -NMR, MS (s. Racemat **76**)
HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm

Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 95:5:0,1
 Flussrate: 1 ml/min
 Detektion: 230 nm
 Retentionszeit: $t_R = 13,03$ min
 ee: > 99 %

(S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethoxybenzilat, 10

$C_{21}H_{22}F_3NO_4$

M_r : 409,40 g/mol
 Ausbeute: 68 % (Reaktionszeit 5 h)
 F_p : 100°C (Diethylether)
 $[\alpha]_D^{20}$: + 8,3 (c = 0,84; Methanol)
 Analytik: DC, UV, 1H -NMR, ^{13}C -NMR, ^{19}F -NMR, MS (s. Racemat **76**)
 HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm
 Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 95:5:0,1
 Flussrate: 1 ml/min
 Detektion: 230 nm
 Retentionszeit: $t_S = 10,48$ min
 ee: 97,6 %

(R)-N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethylbenzilat, 11

$C_{21}H_{22}F_3NO_3$

M_r : 393,40 g/mol
 Ausbeute: Racemattrennung durch fraktionierte Kristallisation (Kap. 3.1.3)
 F_p : 135°C (Diethylether)
 $[\alpha]_D^{20}$: - 16,8° (c = 2; Ethanol)
 Analytik: DC, UV, 1H -NMR, ^{13}C -NMR, ^{19}F -NMR, MS (s. Racemat **77**)
 HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm
 Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 95:5:0,1
 Flussrate: 1 ml/min
 Detektion: 230 nm
 Retentionszeit: $t_R = 15,28$ min
 ee: > 99 %

(S)- N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethylbenzilat, 12

$C_{21}H_{22}F_3NO_3$

M_r : 393,40 g/mol
 Ausbeute: 78 % d. Th. (Reaktionszeit 5 h)
 F_p : 135°C (Diethylether)

$[\alpha]_D^{20}$: + 16,8° (c = 2; Ethanol)
 Analytik: DC, UV, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, ^{19}F -NMR, MS (s. Racemat **77**)
 HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm
 Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 95:5:0,1
 Flussrate: 1 ml/min
 Detektion: 230 nm
 Retentionszeit: $t_S = 11,41$ min
 ee: 96,8 %

(R)-N-Methyl-4-piperidyl 3,5-dimethoxybenzilat, 13

$\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{NO}_5$
 M_r : 385,47 g/mol
 Ausbeute: Racemattrennung durch Fraktionierte Kristallisation (Kap. 3.1.3)
 F_p : 85°C (Diethylether)
 $[\alpha]_D^{20}$: + 6,0° (c = 0,65; Methanol)
 Analytik: DC, UV, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, MS (s. Racemat **78**)
 HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm
 Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 81:19:0,1
 Flussrate: 1 ml/min
 Detektion: 281 nm
 Retentionszeit: $t_R = 9,62$ min
 ee: 95 %

(S)-N-Methyl-4-piperidyl 3,5-dimethoxybenzilat, 14

$\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{NO}_5$
 M_r : 385,47 g/mol
 Ausbeute: 78 % d. Th. (Reaktionszeit 5 h)
 F_p : 85°C (Diethylether)
 $[\alpha]_D^{20}$: - 6,0° (c = 0,65; Methanol)
 Analytik: DC, UV, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, MS (s. Racemat **78**)
 HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm
 Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 81:19:0,1
 Flussrate: 1 ml/min
 Detektion: 281 nm
 Retentionszeit: $t_S = 11,87$ min
 ee: 96,4 %

(R)-N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat, 15

C₂₁H₂₅NO₄

M_r: 355,42 g/mol

Ausbeute: Racemattrennung durch fraktionierte Kristallisation (Kap. 3.1.3)

F_p: 118-120°C (Diethylether)

[α]_D²⁰: + 4,5° (c = 5,2; Ethanol)

Analytik: DC, UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS (s. Racemat **79**)

HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm

Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 85,5:14,5:0,1

Flussrate: 0,9 ml/min

Detektion: 230 nm

Retentionszeit: t_R = 11,28 min

ee: 97 %

(S)-N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat, 16

C₂₁H₂₅NO₄

M_r: 355,42 g/mol

Ausbeute: 80 % d. Th. (Reaktionszeit 5 h)

F_p: 118-120°C (Diethylether)

[α]_D²⁰: - 4,5° (c = 5,2; Ethanol)

Analytik: DC, UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS (s. Racemat **79**)

HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm

Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 85,5:14,5:0,1

Flussrate: 0,9 ml/min

Detektion: 230 nm

Retentionszeit: t_S = 13,13 min

ee: 97,0 %

(R)-N-Methyl-4-piperidyl 4-methylsulfonylbenzilat, 17

C₂₁H₂₅NO₅S

M_r: 403,49 g/mol

Reinigung: Säulenchromatographie,
Dichlormethan/ammoniakalisch gesättigtes Methanol 9:1

Ausbeute: 72 % (Reaktionszeit nur 1h, Nebenprodukt entsteht)

F_p: 135°C (Diethylether)

[α]_D²⁰: -21,1° (c = 1,1; Methanol)

Analytik: DC, UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS (s. Racemat **80**)

HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm

Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 75:25:0,1

Flussrate: 0,8 ml/min

Detektion: 230 nm
Retentionszeit: $t_R = 18,69$ min
ee: 99,5 %

(S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-methylsulfonylbenzilat, 18

$C_{21}H_{25}NO_5S$

M_r : 403,49 g/mol

Reinigung: Säulenchromatographie,
Dichlormethan/ammoniakalisch gesättigtes Methanol 9:1

Ausbeute: 72 % (Reaktionszeit nur 1h, Nebenprodukt entsteht)

F_p : 135°C (Diethylether)

$[\alpha]_D^{20}$: +21,1° (c = 1,1; Methanol)

Analytik: DC, UV, 1H -NMR, ^{13}C -NMR, MS (s. Racemat **80**)

HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm

Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 75:25:0,1

Flussrate: 0,8 ml/min

Detektion: 230 nm

Retentionszeit: $t_S = 20,18$ min

ee: 99,0 %

4.3.2 Darstellung der Racemate substituierter N-Methyl-4-piperidyl benzilate

4.3.2.1 Darstellung racemischer Methyl benzilate

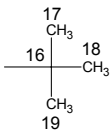
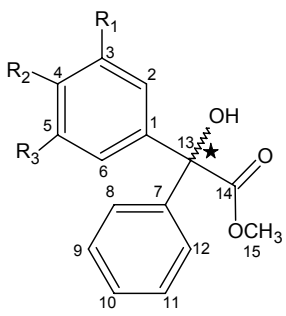
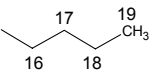
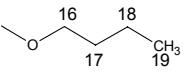
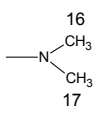





(*R,S*)-Methyl 4-*tert*-butylbenzilat (**63**), (*R,S*)-Methyl 4-n-butylbenzilat (**64**), (*R,S*)-Methyl 4-butoxybenzilat (**65**), (*R,S*)-Methyl 4-trifluormethoxybenzilat (**67**), (*R,S*)-Methyl 4-trifluormethylbenzilat (**68**), (*R,S*)-Methyl 3-methoxybenzilat (**69**), (*R,S*)-Methyl 4-methylmercaptobenzilat (**70**): 1,0 Moläquivalente des substituierten GRIGNARD-Reagenzes in Tetrahydrofuran werden langsam zu 0,85 Moläquivalenten Phenylglyoxylsäuremethylester in Tetrahydrofuran zugetropft. Nach der Zugabe erhitzt man unter Rühren 1,5 bis 2 h. Die Lösung wird mit 40 ml 10 %iger Ammoniumchlorid-Lösung versetzt und zweimal mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wird über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Die Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie.

(*R,S*)-Methyl 4-dimethylaminobenzilat (**66**): 1,2 Moläquivalente 4-Dimethylaminophenylmagnesiumbromid in Tetrahydrofuran werden langsam zu 1,0 Moläquivalenten Methyl phenylglyoxylat in Tetrahydrofuran bei 0°C getropft. Die Lösung wird 1 h unter Eiskühlung gerührt, dann 0,5 h bei Raumtemperatur. Es wird mit 10 %iger Ammoniumchlorid-Lösung hydrolysiert. Die wässrige Lösung wird auf pH 1 eingestellt und mit Diethylether extrahiert. Mit 6 N Natriumhydroxid-Lösung wird die wässrige Phase alkalisiert und dreimal mit Chloroform ausgeschüttelt. Die organischen Phasen werden

vereinigt, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Die Reinigung erfolgt durch Umkristallisation aus Methanol.

(*R,S*)-Methyl 4-methylsulfonylbenzilat (**71**): 4 mmol (*R,S*)-Methyl 4-methylmercaptoben-
 zilat werden in 30 ml Dichlormethan gelöst und mit einer Lösung aus 8 mmol
 3-Chlorperbenzoesäure (55 %) in 20 ml Dichlormethan behandelt. Die Lösung wird
 90 min stehen gelassen, dreimal mit 10 %iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und
 zweimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über wasserfreiem
 Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt [122]. Die Reinigung erfolgt
 durch Säulenchromatographie.

Tab. 33: Bezifferung der racemischen (*R,S*)-Methyl benzilate

Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	Formel
63	H		H	
64	H		H	
65	H		H	
66	H		H	
67	H		H	
68	H		H	
69		H	H	
70	H		H	
71	H		H	

(*R,S*)-Methyl 4-*tert*-butylbenzilat, 63

C₁₉H₂₂O₃

M_r: 298,38 g/mol

Reinigung: n-Hexan/Ethylacetat 8:2

Ausbeute: 63 %

DC: FM I: R_f = 0,55

Detektion: A, C (pink)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 1,24 s (9H, CH₃, C-17 bis C-19); 3,90(3H, CH₃, C-15) 7,22-7,59 m (9H, Ar-H, C-8 bis C-12, sAr-H, C-2, C-3, C-5, C-6)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 31,3 (C-17 bis C-19); 34,5 (C-16); 52,8 (C-15); 80,9 (C-13); 125,0 (C-2, C-6); 127,0 (C-8, C-12); 128,0 (C-3, C-5, C-10); 128,9 (C-9, C-11); 138,9 (C-1); 141,9 (C-7); 150,9 (C-4); 175,1 (C-14)

MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 298 (1), 283 (3), 239 (96), 161 (32), 105 (100), 77 (61)

(*R,S*)-Methyl 4-*n*-butylbenzilat, 64

C₁₉H₂₂O₃

M_r: 298,38 g/mol

Reinigung: Säulenchromatographie, Cyclohexan/Ethylacetat 9:1

Ausbeute: 52 %

DC: FM I: R_f = 0,69

Detektion: A, C (weinrot)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 0,85 t (3H, CH₃, C-19); 1,29 m (2H, CH₂, C-18); 1,52 m (2H, CH₂, C-17); 2,53 t (2H, CH₂, C-16); 3,77 s (3H, CH₃, C-15); 7,06-7,36 m (9H, Ar-H, C-8 bis C-12, sAr-H, C-2, C-3, C-5, C-6)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 13,9 (C-19); 22,4 (C-18); 33,4 (C-17); 35,2 (C-16); 53,5 (C-15); 80,9 (C-13); 127,2 (C-2, C-6); 127,4 (C-8, C-12); 128,0 (C-10); 128,0 (C-3, C-5); 128,1 (C-9, C-11); 139,2 (C-1); 141,9 (C-7); 142,8 (C-4); 175,1 (C-14)

MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 298 (1), 239 (100), 161 (16), 105 (58), 77 (15)

(*R,S*)-Methyl 4-butoxybenzilat, 65

C₁₉H₂₂O₄

M_r: 314,38 g/mol

Reinigung: Säulenchromatographie, n-Hexan/Ethylacetat 9:1

Ausbeute: 65 %

DC: FM I: R_f = 0,40

Detektion: A, C (orangebraun)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 0,90 t (3H, CH₃, C-19); 1,41 m (2H, CH₂, C-18); 1,69 m (2H, CH₂, C-17); 3,88 t (2H, CH₂, C-16); 3,77 s (3H, CH₃, C-15); 6,77-6,79 d (2H, sAr-H, C-3, C-5); 7,18-7,37 m (7H, sAr-H, C-2, C-

6; Ar-H, C-8 bis C-12)

^{13}C -NMR: δ_{C} [ppm] (75 MHz, CDCl_3 , TMS): 13,8 (C-19); 19,2 (C-18); 31,3 (C-17); 53,5 (C-15); 67,6 (C-16); 80,8 (C-13); 114,0 (C-3, C-5); 127,3 (C-8, C-12); 128,0 (C-10); 128,1 (C-2, C-6); 128,6 (C-9, C-11); 133,8 (C-1); 142,1 (C-7); 158,9 (C-4); 175,2 (C-14)

MS: m/z ($I_{\text{rel.}}$ [%]): M^+ 314 (2), 255 (77), 199 (12), 121(25), 105 (31), 77 (15)

(*R,S*)- Methyl 4-dimethylaminobenzilat, 66

$\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_3$

M_{r} : 285,34 g/mol

Reinigung: Umkristallisation aus Methanol

Ausbeute: 21 %

F_{p} : 124 °C (Methanol)

DC: FM I: R_{f} = 0,32

Detektion: A, C (ohne Erhitzen: gelb), D (orange)

^1H -NMR: δ_{H} [ppm] (300 MHz, CDCl_3 , TMS): 2,9s (6H, CH_3 , C-16, C-17); 3,77 s (3H, CH_3 , C-15); 4,02 (1H, OH); 6,73 d (2H, sAr-H, C-3, C-5); 7,22 m (5H, Ar-H, C-8 bis C-12); 7,37 d (2H, sAr-H, C-2, C-6)

^{13}C -NMR: δ_{C} [ppm] (75 MHz, CDCl_3 , TMS): 40,5 (C-16, C-17); 53,4 (C-15); 80,8 (C-13); 111,8 (C-3, C-5); 127,3 (C-2, C-6); 127,9 (C-10); 128,0 (C-8, C-12); 128,3 (C-9, C-11); 142,2 (C-7); 151,0 (C-4); 175,4 (C-14)

MS: m/z ($I_{\text{rel.}}$ [%]): M^+ 285 (23), 226 (100), 148 (27), 105 (71), 77 (38)

(*R,S*)-Methyl 4-trifluormethoxybenzilat, 67

$\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{O}_4$

M_{r} : 326,27 g/mol

Ausbeute: 62 % d. Th.

DC: FM I: R_{f} = 0,55

Detektion: A, C (pink)

^1H -NMR: δ_{H} [ppm] (300 MHz, CDCl_3 , TMS): 3,80 s (3H, CH_3 , C-15) 7,09-7,11 d (2H, sAr-H, C-3, C-5); 7,27-7,30 m (5H, Ar-H, C-8 bis C-12); 7,43-7,46 d (2H, sAr-H, C-2, C-6)

^{13}C -NMR: δ_{C} [ppm] (75 MHz, CDCl_3 , TMS): 53,7 (C-15); 80,6 (C-13); 120,3 (C-3, C-5); 122,1 (C-16); 127,1 (C-8, C-12); 128,3 (C-9, C-10, C-11); 129,0 (C-2, C-6); 140,3 (C-1); 141,6 (C-7); 148,9 (C-4); 174,5 (C-14)

^{19}F -NMR: δ_{F} [ppm] (282 MHz, CDCl_3 , TMS): -58,04

MS: m/z ($I_{\text{rel.}}$ [%]): M^+ 326 (2), 267 (100), 189 (90), 161 (15), 105 (75), 77 (50)

(*R,S*)- Methyl 4-trifluormethylbenzilat, 68

$\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{O}_3$

M_{r} : 310,26 g/mol

Ausbeute: 69 % d. Th.

DC: FM II: R_{f} = 0,91

Detektion: A, C (himbeerrot)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 3,80 s (3H, CH₃, C-15); 4,20 s (1H, OH); 7,20-7,35 m (5H, Ar-H, C-8 bis C-12); 7,45-7,60 m (4H, sAr-H, C-2, C-3, C-5, C-6)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 53,8 (C-15); 80,8 (C-13); 124,9 (C-3, C-5); 127,9 (C-2, C-6); 127,1 (C-9, C-11); 128,4 (C-8, C-12); 128,5 (C-10); 130,2 (C-4); 141,4 (C-7); 145,5 (C-7); 174,3 (C-14)

¹⁹F-NMR: δ_F [ppm] (282 MHz, CDCl₃, TMS): -63,08

MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 310 (1), 251 (56), 173 (100), 145 (46), 105 (38), 77 (41)

(R,S)-Methyl 3-methoxybenzilat, 69

C₁₆H₁₆O₄

M_r: 272,29 g/mol

Ausbeute: 79 % d. Th.

DC: FM II: R_f = 0,94

Detektion: A, C (blau)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 3,69 s (3H, OCH₃); 3,77 s (3H, CH₃, C-15); 4,13 s (1H, OH); 6,78-6,80 d (1H, sAr-H, C-4); 6,91-6,93 m (2H, sAr-H, C-2, C-6); 7,15-7,21 t (1H, sAr-H, C-5); 7,24-7,26 m (3H, Ar-H, C-9 bis C-11); 7,33-7,36 m (2H, Ar-H, C-8, C-12)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 53,6 (C-15); 55,2 (OCH₃); 81,0 (C-13); 113,3 (C-2); 113,4 (C-4); 119,8 (C-6); 127,3 (C-8, C-12); 128,06 (C-9, C-11); 128,08 (C-10); 129,4 (C-5); 141,7 (C-7); 143,3 (C-1); 159,4 (C-3); 174,8 (C-14)

MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 272 (1), 213 (36), 135 (11), 105 (100), 77 (44)

HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm

Fließmittel: Methanol

Flussrate: 0,3 ml/min

Detektion: 281 nm

Retentionszeit: t_S = 10,81 min t_R = 13,98 min

(R,S)-Methyl 4-methylmercaptobenzilat, 70

C₁₆H₁₆O₃S

M_r: 288,36 g/mol

Reinigung: Säulenchromatographie, n-Hexan/Ethylacetat 8:2

Ausbeute: 85 % d. Th.

F_p: 76°C (Methanol)

DC: FM I: R_f = 0,39

Detektion: A, C (violett)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 2,40 s (3H, CH₃, C-16); 3,78 s (3H, CH₃, C-15); 7,12-7,33 m (9H, sAr-H, C-2, C-3, C-5, C-6, Ar-H, C-8 bis C-12)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 15,5 (C-16); 53,6 (C-15); 125,8 (C-3, C-

5); 127,2 (C-8, C-12); 127,8 (C-2, C-6); 128,1 (C-10); 128,2 (C-9, C-11);
138,6 (C-4); 139,1 (C-1); 141,8 (C-7); 174,9 (C-14)
MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 288 (21), 229 (100), 151 (56), 105 (93), 77 (47)

(*R,S*)- Methyl 4-methylsulfonylbenzilat, 71

C₁₆H₁₆O₅S

M_r: 320,36 g/mol

Reinigung: Säulenchromatographie, n-Hexan/Ethylacetat 3:7

Ausbeute: 69 % d. Th.

DC: FM I: R_f = 0,05

Detektion: A, C (rosa)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 2,99 s (3H, CH₃, C-16); 3,82 s (3H, CH₃, C-15); 4,25 s (1H, OH); 7,29 m (5H, Ar-H, C-8 bis C-12); 7,60-7,63 d (2H, sAr-H, C-2, C-6); 7,82-7,85 d (2H, sAr-H, C-3, C-5)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 44,4 (C-16); 54,0 (C-15); 80,7 (C-13); 127,0 (C-8, C-12); 127,1 (C-3, C-5); 128,5 (C-9, C-11); 128,6 (C-2, C-6, C-10); 140,0 (C-1); 141,3 (C-7); 147,6 (C-4); 173,8 (C-14)

MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 320 (2), 261 (100), 183 (87), 105 (88), 77 (64)

4.3.2.2 Darstellung racemischer N-Methyl-4-piperidyl benzilate

Die Synthese von (*R,S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-*tert*-butylbenzilat (**72**), (*R,S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-*n*-butylbenzilat (**73**), (*R,S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-butoxybenzilat (**74**), (*R,S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-dimethylaminobenzilat (**75**), (*R,S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethoxybenzilat (**76**), (*R,S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethylbenzilat (**77**), (*R,S*)-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (**79**), (*R,S*)-Methyl-4-piperidyl 4-methylsulfonylbenzilat (**80**), (*R,S*)-N-Methyl-4-piperidyl 3-trifluormethoxybenzilat (**89**) erfolgt ausgehend vom racemischen Methyl benzilat in Analogie zur Synthese der enantiomeren N-Methyl-4-piperidyl benzilate (Kap. 4.3.1.6). Das Racemat von (*R,S*)-N-Methyl-4-piperidyl 3,5-dimethoxybenzilat (**78**) wird über eine Benzilsäureumlagerung und nachfolgende Veresterungsschritte erhalten [5].

Tab. 34: Bezifferung der racemischen (*R,S*)-N-Methyl-4-piperidyl benzilate

Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	Formel
72	H		H	
73	H		H	
74	H		H	
75	H		H	
76	H		H	
77	H		H	
78		H		
79		H	H	
80	H		H	
81		H	H	

(*R,S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-*tert*-butylbenzilat, 72

C₂₄H₃₁NO₃

M_r: 381,51 g/mol

Ausbeute: 64 % (Reaktionszeit 5 h)

F_p: 127 °C (Methanol)

DC: FM II: R_f = 0,84

Detektion: A, C (rotviolett), D (orange)

UV: 212, 231, 275 (1415), 282 (1152)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 1,24 s (9H, CH₃, C-22 bis C-24); 1,73 m (2H, CH₂, C-16, C-20); 1,97 m (2H, CH₂, C-16, C-20); 2,17 m (5H, CH₃, C-

18, CH_2 , C-17, C-19); 2,37 m (2H, CH_2 , C-17, C-19); 4,23 s (1H, OH); 4,96 m (1H, CH , C-15); 7,27-7,33 m (7H, sAr-H, C-2, C-6, Ar-H, C-8 bis C-12); 7,37-7,39 d (2H, sAr-H, C-3, C-5)

^{13}C -NMR: δ_{C} [ppm] (75 MHz, CDCl_3 , TMS): 29,3 (C-16, C-20); 36,3 (C-21) 45,3 (C-18); 51,2 (C-17, C-19); 70,5 (C-15); 80,8 (C-13); 125,03 (C-2, C-6); 127,0 (C-8, C-12); 127,42 (C-3, C-5); 127,95 (C-10); 128,00 (C-9, C-11); 139,03 (C-1); 142,05 (C-7); 151,0 (C-4); 173,7 (C-14)

MS: m/z ($I_{\text{rel.}}$ [%]): M^+ 381 (5), 239 (73), 161(11), 105 (100), 99 (57), 98 (71), 96 (64), 77 (33)

CHN: theor. [%] C: 75,56 H: 8,19 N: 3,67 O: 12,58
gef. [%] C: 75,01 H: 8,22 N: 3,81 O: 12,96

HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm
Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 67:33:0,1
Flussrate: 1 ml/min
Detektion: 230 nm
Retentionszeit: $t_{\text{R}} = 23,89$ min $t_{\text{S}} = 25,93$ min

(R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-n-butylbenzilat, 73

$\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{NO}_3$

M_{r} : 381,51 /mol

Ausbeute: 74 % (Reaktionszeit 5 h)

F_{p} : 88 °C (Aceton)

DC: FM II: $R_{\text{f}} = 0,87$

Detektion: A, C (weinrot), D (orange)

UV: 209, 258 (525), 263 (508)

^1H -NMR: δ_{H} [ppm] (300 MHz, CDCl_3 , TMS): 0,85 t (3H, CH_3 , C-24); 1,27 m (2H, CH_2 , C-23); 1,50 m (2H, CH_2 , C-22); 1,67 m (2H, CH_2 , C-16, C-20); 1,85 m (2H, CH_2 , C-16, C-20); 2,20 br (7H, CH_3 , C-18, CH_2 , C-17, C-19); 2,53 t (2H, CH_2 , C-21); 4,23 br (1H, OH); 4,92 m (1H, CH , C-15); 7,07 d (2H, sAr-H, C-3, C-5); 7,22-7,39 m (7H, sAr-H, C-2, C-6, Ar-H, C-8 bis C-12)

^{13}C -NMR: δ_{C} [ppm] (75 MHz, CDCl_3 , TMS): 13,5 (C-24); 21,9 (C-23); 29,5 (C-16, C-20); 33,1 (C-22); 34,8 (C-21); 45,4 (C-18); 51,2 (C-17, C-19); 80,4 (C-13); 126,8 (C-2, C-6); 127,0 (C-8, C-12); 127,4 (C-10); 127,5 (C-3, C-5); 127,6 (C-9, C-11); 138,9 (C-1); 142,1 (C-7); 142,3 (C-4); 173,5 (C-14)

MS: m/z ($I_{\text{rel.}}$ [%]): M^+ 381 (10), 239 (100), 161 (59), 105 (50), 99 (14), 98 (14), 96 (19), 77 (16)

CHN: theor. [%] C: 75,56 H: 8,19 N: 3,67 O: 12,58
gef. [%] C: 75,38 H: 8,38 N: 3,64 O: 12,60

HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm

Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 24:76:0,1

Flussrate: 0,3 ml/min

Detektion: 230 nm

Retentionszeit: $t_{\text{S}} = 16,75$ min $t_{\text{R}} = 17,57$ min

(R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-butoxybenzilat, 74

C₂₄H₃₁NO₄

M_r: 397,51 g/mol

Ausbeute: 67 % (Reaktionszeit 5 h)

F_p: 125 °C (Diethylether)

DC: FM II: R_f = 0,83

Detektion: A, C (braun), D (orange)

UV: 212, 231, 275 (1415), 282 (1152)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 0,90 t (3H, CH₃, C-24); 1,41 m (2H, CH₂, C-23); 1,69 m (4H, CH₂, C-22, CH₂, C-16, C-20); 1,90 br (2H, CH₂, C-16, C-20); 2,20 br (7H, CH₃, C-18, CH₂, C-17, C-19); 4,16 s (1H, OH); 4,93 m (1H, CH, C-15); 7,78 d (2H, sAr-H, C-3, C-5); 7,22-7,38 m (7H, sAr-H, C-2, C-6, Ar-H, C-8 bis C-12)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 13,8 (C-24); 19,2 (C-23); 29,8 (C-16, C-20); 31,3 (C-22); 45,7 (C-18); 51,6 (C-17, C-19); 67,7 (C-21); 80,6 (C-13); 113,9 (C-3, C-5); 127,4 (C-8, C-12); 127,94 (C-10); 128,0 (C-2, C-6); 128,6 (C-9, C-11); 133,9 (C-1); 142,3 (C-7); 158,9 (C-4); 174,0 (C-14)

MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 397 (5), 255 (100), 199 (14), 121 (33), 105 (29), 99 (40), 98 (21), 96 (15)

CHN: theor. [%] C: 75,52 H: 7,86 N: 3,52 O: 16,10

gef. [%] C: 75,20 H: 8,00 N: 3,52 O: 16,28

HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm

Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 95:5:0,1

Flussrate: 0,7 ml/min

Detektion: 230 nm

Retentionszeit: t_S = 29,49 min t_R = 30,87 min

(R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-dimethylaminobenzilat, 75

C₂₂H₂₈N₂O₃

M_r: 368,47 g/mol

Ausbeute: 69 % (Reaktionszeit 5 h)

F_p: 135 °C (Chloroform)

DC: FM I: R_f = 0,81

Detektion: A, C (ohne Erhitzen, gelb), D (orange)

UV: 205, 262 (19012), 290 (Schulter)

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 1,73 m (2H, CH₂, C-16, C-20); 1,98 m (2H, CH₂, C-16, C-20); 2,21 s (3H, CH₃, C-18); 2,41 m (4H, CH₂, C-17, C-19); 2,89 s (6H, CH₃, C-21, C-22); 4,07 s (1H, OH); 4,96 m (1H, CH, C-15); 6,58-6,63 d (2H, sAr-H, C-3, C-5); 7,15-7,30 m (5H, Ar-H, C-8 bis C-12); 7,37-7,40 d (2H, sAr-H, C-2, C-6)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 30,1 (C-16, C-20); 40,5 (C-21, C-22); 45,9 (C-18); 51,8 (C-17, C-19); 80,7 (C-13); 111,7 (C-3,5); 127,5 (C-2, C-6); 127,8 (C-10); 127,9 (C-8, C-12); 128,2 (C-9, C-11); 129,6 (C-1); 142,5 (C-7); 150,12 (C-4); 172,3 (C-14)

MS: m/z ($I_{\text{rel.}}$ [%]): M^+ 368 (3), 226 (85), 148 (18), 105 (100), 99 (23), 98 (16), 96 (8), 77 (37)

CHN: theor. [%] C: 71,71 H: 7,66 N: 7,60 O: 13,03
 gef. [%] C: 71,63 H: 7,61 N: 7,58 O: 13,18

HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm
 Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 85,5:14,5:0,1
 Flussrate: 0,9 ml/min
 Detektion: 281 nm
 Retentionszeit: t_R = 14,89 min t_S = 15,87 min

(*R,S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethoxybenzilat, 76

$C_{21}H_{22}F_3NO_4$

M_r : 409,40 g/mol
 Ausbeute: 68 % (Reaktionszeit 5 h)
 F_p : 125 °C (Aceton)
 DC: FM II: R_f = 0,83
 Detektion: A, C (rot), D (orange)

UV: 205, 252 (1148), 258 (1293), 264 (1107)

1H -NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, $CDCl_3$, TMS): 1,69 m (2H, \underline{CH}_2 , C-16, C-20); 1,91 m (2H, \underline{CH}_2 , C-16, C-20); 2,15 s (3H, \underline{CH}_3 , C-18); 2,37 m (4H, \underline{CH}_2 , C-17, C-19); 4,43 s (1H, \underline{OH}); 4,97 m (1H, \underline{CH} , C-15); 7,10-7,13 d (2H, sAr- \underline{H} , C-3, C-5); 7,27-7,35 m (5H, Ar- \underline{H} , C-8 bis C-12); 7,40-7,43 d (2H, sAr- \underline{H} , C-2, C-6)

^{13}C -NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, $CDCl_3$, TMS): 30,3 (C-16, C-20); 46,0 (C-18); 52,0 (C-17, C-19); 71,6 (C-15); 80,4 (C-13); 118,7 (C-21); 120,3 (C-3, C-5); 127,2 (C-8, C-12); 128,3 (C-9, C-10, C-11); 129,1 (C-2, C-6); 140,6 (C-1); 141,8 (C-7); 150,2 (C-4); 173,4 (C-14)

^{19}F -NMR: δ_F [ppm] (282 MHz, $CDCl_3$, TMS): -58,07

MS: m/z ($I_{\text{rel.}}$ [%]): M^+ 409 (5), 267 (30), 189 (48), 161 (8), 105 (35), 99 (29), 98 (100), 97 (21), 96 (74), 77 (31)

CHN: theor. [%] C: 61,61 H: 5,42 N: 3,42
 gef. [%] C: 61,78 H: 5,40 N: 3,45

HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm
 Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 95:5:0,1
 Flussrate: 1 ml/min
 Detektion: 230 nm
 Retentionszeit: t_S = 10,48 min t_R = 13,03 min

(*R,S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethylbenzilat, 77

$C_{21}H_{22}F_3NO_3$

M_r : 393,40 g/mol
 Ausbeute: 78 % d. Th. (Reaktionszeit 5 h)

F_p: 115-116°C (Diethylether)
MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 393 (5), 251 (15), 173 (33), 145 (22), 105 (17), 99 (14), 98 (100), 97 (24), 96 (77), 82 (11), 77 (20)
Analytik: DC, UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹⁹F-NMR [5]
HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm
 Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 95:5:0,1
 Flussrate: 1 ml/min
 Detektion: 230 nm
 Retentionszeit: t_S = 11,41 min t_R = 15,28 min

(*R,S*)-N-Methyl-4-piperidyl 3,5-dimethoxybenzilat, 78

C₂₂H₂₇NO₅

M_r: 385,47 g/mol
Synthese: [5]
F_p: 136-137 °C (Diethylether)
MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 385 (3), 243 (17), 105 (100), 99 (59), 98 (45), 97 (26), 96 (61), 77 (33)
Analytik: DC, UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR [5]
HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm
 Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 81:19:0,1
 Flussrate: 1 ml/min
 Detektion: 281 nm
 Retentionszeit: t_R = 9,62 min t_S = 11,87 min

(*R,S*)-N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat, 79

C₂₁H₂₅NO₄

M_r: 355,42 g/mol
Ausbeute: 80 % d. Th.
F_p: 100-101 °C (Chloroform/Diethylether)
MS: m/z (I_{rel.} [%]): M⁺ 355 (1), 213 (31), 135 (11), 105 (100), 99 (57), 98 (62), 97 (13), 96 (63), 82 (10), 77 (50)
Analytik: DC, UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR [5]
HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm
 Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 85,5:14,5:0,1
 Flussrate: 0,9 ml/min
 Detektion: 230 nm
 Retentionszeit: t_R = 11,28 min t_S = 13,13 min

(R,S)-Methyl-4-piperidyl 4-methylsulfonylbenzilat, 80 $C_{21}H_{25}NO_5S$ M_r : 403,49 g/molReinigung: Säulenchromatographie,
Dichlormethan/ammoniakalisch gesättigtes Methanol 9:1

Ausbeute: 72 % (Reaktionszeit nur 1 h, Nebenprodukt entsteht)

 F_p : 144°C (Methanol)DC: FM II: R_f = 0,71

Detektion: A, C (rosa), D (orange)

UV: 204, 220 (Schulter), 266 (1081), 274 (817)

 1H -NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, $CDCl_3$, TMS): 1,59-1,74 m (2H, CH_2 , C-16, C-20); 1,81-1,92 m (2H, CH_2 , C-16, C-20); 2,13 s (3H, CH_3 , C-18); 2,17-2,34 m (4H, CH_2 , C-17, C-19); 2,99 s (3H, CH_3 , C-19); 4,60 s (1H, OH); 4,92-4,94 m (1H, CH , C-15); 7,30 m (5H, Ar-H, C-8 bis C-12); 7,61-7,64 d (2H, sAr-H, C-2, C-6); 7,82-7,85 d (2H, sAr-H, C-3, C-5) ^{13}C -NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, $CDCl_3$, TMS): 30,0 (C-16, C-20), 44,4 (C-21); 45,8 (C-18); 51,9 (C-17, C-19); 80,57 (C-13); 127,0 (C-8, C-12); 127,0 (C-3, C-5); 128,4 (C-9, C-11); 128,5 (C-10); 128,6 (C-2, C-6); 140,0 (C-1); 141,4 (C-7); 148,0 (C-4); 172,7 (C-14)MS: m/z ($I_{rel.}$ [%]): M^+ 403 (39), 261 (32), 183(18), 105 (55), 99 (12), 98 (100), 96 (58), 77 (28)

CHN:	theor. [%]	C: 62,51	H: 6,25	N: 3,47	O: 19,83	S: 7,95
	gef. [%]	C: 62,42	H: 6,32	N: 3,45	O: 19,89	S: 7,92

HPLC: Chiralpak-AD 250 mm x 4,6 mm

Fließmittel: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 75:25:0,1

Flussrate: 0,8 ml/min

Detektion: 230 nm

Retentionszeit: t_R = 18,69 min t_S = 20,18 min**(R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 3-trifluormethoxybenzilat, 81** $C_{21}H_{22}F_3NO_4$ M_r : 409,40 g/mol

Ausbeute: 68 % (Reaktionszeit 5 h), (Synthese, Kap. 4.3.2)

 F_p : 114 °C (Chloroform)DC: FM II: R_f = 0,83

Detektion: A, C (rot), D (orange)

MS: m/z ($I_{rel.}$ [%]): M^+ 409 (8), 267 (10), 161 (8), 105 (28), 98 (100), 77 (23)


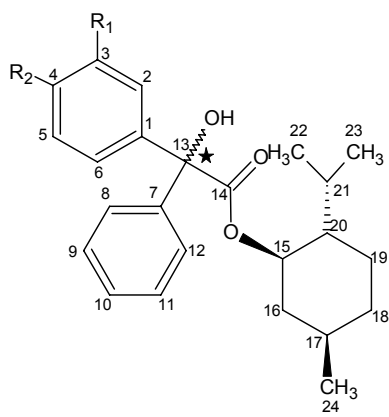





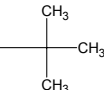
CHN:	theor. [%]	C: 61,61	H: 5,42	N: 3,42
	gef. [%]	C: 61,02	H: 5,62	N: 3,29

4.3.2.3 Darstellung substituierter (-)-Menthyl (*R,S*)-benzilate

1 mmol substituiertes Methyl benzilat und 1,2 mmol (-)-Menthol werden in 20 ml Petroleumbenzin ($K_p = 60-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) vorgelegt. Zur Entfernung von Wasserspuren werden 5 ml Lösungsmittel abdestilliert. Anschließend wird 0,05 ml einer frisch bereiteten 10 %igen methanolischen Natriummethanolat-Lösung langsam zur Reaktionsmischung zugetropft und die Destillationsgeschwindigkeit so geregelt, dass innerhalb von 5 h das Petroleumbenzin sowie vorhandenes und entstehendes Methanol abgetrieben werden. Der Rückstand wird über Säulenchromatographie (n-Hexan/Ethylacetat) gereinigt. Die Ausbeuten liegen zwischen 50 bis 70 % der Theorie.

Zur analytischen Charakterisierung der (-)-Menthyl benzilate werden an dieser Stelle nur die Massespektren angegeben. Weiterhin wurden $^1\text{H-NMR}$ Untersuchungen zur chemischen Verschiebung der Protonen im Arylsubstituenten durchgeführt (s. Tab. 18, Kap. 3.2.3).

Tab. 35: Synthetisierte (-)-Menthyl (*R,S*)-benzilate

Nr.	R ₁	R ₂	Formel
82	H		
83	H		
84		H	
85			
86	H		
87	H		

(-)-Menthyl (*R,S*)-4-dimethylaminobenzilat, 82

$\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{NO}_3$

M_r : 409,56 g/mol

MS: m/z ($I_{\text{rel.}}$ [%]): M^+ 409 (16), 226 (100), 148 (27), 105 (77), 77 (27)

(-)-Menthyl (*R,S*)-4-trifluormethoxybenzil, 83

$\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{F}_3\text{O}_4$

M_r : 450,49 g/mol

MS: m/z ($I_{\text{rel.}}$ [%]): M^+ 450 (1), 267 (100), 189 (82), 138 (8), 105 (49), 77 (13)

(-)-Menthyl (*R,S*)-3-methoxybenzilat, 84 $C_{25}H_{32}O_4$ M_r : 396,52 g/molMS: m/z ($I_{rel.}$ [%]): M^+ 396 (4), 213 (100), 135 (8), 105 (44), 77 (17)**(-)-Menthyl (*R,S*)-3,4-dimethoxybenzilat, 85** $C_{26}H_{34}O_5$ M_r : 426,55 g/molMS: m/z ($I_{rel.}$ [%]): M^+ 426 (0,5), 165 (3), 105 (100), 77 (21)**(-)-Menthyl (*R,S*)-4-methylsulfonylbenzilat, 86** $C_{25}H_{32}O_5S$ M_r : 444,58 g/molMS: m/z ($I_{rel.}$ [%]): kein M^+ , 261 (33), 183 (15), 138 (44), 119 (94), 105 (41)**(-)-Menthyl (*R,S*)-4-*tert*-butylbenzilat, 87** $C_{28}H_{38}O_3$ M_r : 422,60 g/molMS: m/z ($I_{rel.}$ [%]): 422 (2), 239 (100), 161 (10), 105 (77), 77 (23)**4.3.3 Kristallisationsmethoden****4.3.3.1 Fraktionierte Kristallisation**

Allgemeine Arbeitsvorschrift. Zur Lösung der racemischen Base im angegebenen Lösungsmittel wird 1 Moläquivalent der chiralen Säuren O,O'-Dibenzoylweinsäure/O,O'-Di-*p*-toluoylweinsäure im Verhältnis 1:10 hinzugegeben. Die Mischung wird zum Sieden erhitzt, das auskristallisierte Salz abfiltriert und gewaschen. Anschließend wird das Salz in 1 N Natriumhydroxid-Lösung aufgenommen und mit Diethylether extrahiert. Um noch vorhandene Rückstände von Weinsäurederivaten aus der organischen Phase zu entfernen, wird die Etherphase nochmals mit 1 N Natriumhydroxid-Lösung geschüttelt. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Der Enantiomerenüberschuss wird mittels HPLC (s. Methode der entsprechenden Verbindung) bestimmt.

(-)-(*R*)-/(+)-(*S*)-N-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethylbenzilat, (**11/12**): Das (+)-(*S*)-Enantiomer (**12**) bildet bevorzugt mit (+)-O,O'-Dibenzoylweinsäure/(+)-O,O'-Di-*p*-toluoylweinsäure in einer Mischung aus Diethylether/Methanol als Lösungsmittel ein Salz und das (-)-(*R*)-Enantiomer (**11**) entsprechend mit (-)-O,O'-Dibenzoylweinsäure/(-)-O,O'-Di-*p*-toluoylweinsäure. Nach 2-3maliger Umkristallisation wird das reine Enantiomer (*R*: 98 % ee, *S*: 98 % ee) mit einer Ausbeute von 80 % bezogen auf den Enantiomergehalt erhalten.

(+)-(R)/(-)-(S)-N-Methyl-4-piperidyl 3,5-dimethoxybenzilat (**13/14**): Das (+)-(R)-Enantiomer (**13**) bildet bevorzugt mit (-)-O,O'-Dibenzoylweinsäure/(-)-O,O'-Di-*p*-toluoylweinsäure in Isobutylethylketon als Lösungsmittel ein Salz und das (-)-(S)-Enantiomer (**14**) entsprechend mit (+)-O,O'-Dibenzoylweinsäure/(+)-O,O'-Di-*p*-toluoylweinsäure. Nach viermaliger Umkristallisation wird das reine Enantiomer (*R*: 95 % ee, *S*: 99 % ee) mit einer Ausbeute von 72 % bezogen auf den Enantiomerengehalt erhalten.

(*R*)-/(*S*)-N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat, (**15/16**). Das (+)-(R)-Enantiomer (**15**) bildet dabei bevorzugt mit (+)-O,O'-Dibenzoylweinsäure/(+)-O,O'-Di-*p*-toluoylweinsäure in Methanol als Lösungsmittel ein Salz und das (-)-(S)-Enantiomer (**16**) entsprechend mit (-)-O,O'-Dibenzoylweinsäure/ (-)-O,O'-Di-*p*-toluoylweinsäure. Nach dreimaliger Umkristallisation wird das reine Enantiomer (*R*: 95 % ee, *S*: 95 % ee) mit einer Ausbeute von 75 % bezogen auf den Enantiomerengehalt gewonnen.

4.3.3.2 Vorzugskristallisation

Es wird eine gesättigte Lösung aus ca. 80 mg (*R,S*)-N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (**79**) in Diethylether hergestellt. Im Anschluss wird die Lösung filtriert. Ein enantiomerenreiner Kristall (ca. 10 mg) von (-)-*S*-N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (**16**) wird der Lösung als Impfkristall hinzugefügt. Zur vorzugsweisen Kristallisation des *S*-Enantiomers wird die Lösung in den Kühlschrank gestellt. Nach Beendigung des Kristallwachstums wird der Kristall entfernt und der Enantiomerenüberschuss der Lösung mittels HPLC ermittelt.

4.4 Analytische Methoden

4.4.1 UV-spektroskopische Untersuchungen

Die UV-Spektren wurden für die Verbindungen in Methanol (HPLC-Qualität) im Wellenlängenbereich 200 bis 400 nm gegen die entsprechenden Lösungsmittel aufgenommen. Die Kalibrierkurven wurden mit fünf verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 10^{-4} bis 10^{-5} mol/l bei der angegebenen Wellenlänge aufgenommen. Die Werte der Regressionskoeffizienten waren >0,990. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ ist auf die Einheit $l \cdot cm^{-1} \cdot mol^{-1}$ bezogen.

4.4.2 Kernresonanzspektroskopische Untersuchungen

Ca. 10 mg Substanz wurden in 0,6 ml Deuteriochloroform oder Dimethylsulfoxid- d_6 gelöst und in 5 mm Probenröhrchen bei 25°C gegen Tetramethylsilan als internen Standard vermessen.

1H -NMR: Eindimensionale 1H -Spektren:
Frequenz 300,13 MHz, 0 -12 ppm Messbreite, 16 bis 32 Akkumulationen
Spektrenauswertung: Bruker-Software

- ^{13}C -NMR:** Eindimensionale ^{13}C -Spektren:
 Frequenz 75,47 MHz, 0-200 ppm Messbreite, 120 bis 240 Akkumulationen
 Zweidimensionale ^{13}C - ^1H -korrelierte Spektren (Absicherung der Zuordnung):
 Bis zu 256 Akkumulationen
- ^{19}F -NMR:** Eindimensionale ^{19}F -Spektren:
 Frequenz 282,40 MHz, 0 bis -75 ppm Messbreite, 8 Akkumulationen

Die Angabe von δ_{C} erfolgt mit einer Dezimalstelle, von δ_{H} und δ_{F} mit zwei Dezimalstellen.

4.4.3 Massenspektrometrische Untersuchungen

EI-MS: EI-Bedingungen: Ionenquellentemperatur 140 bis 175°C. Die Ionisation erfolgte über einen Ionenstoß mit einer Ionisationsenergie von 70 eV. Die m/z-Werte sind den Massenspektren entnommen und mit den relativen Intensitäten (I_{rel} in %) aufgeführt.

4.4.4 Chromatographische Methoden

4.4.4.1 Analytische Dünnschichtchromatographie

Für die analytische DC wurden DC-Alufolien, Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) verwendet. Die Entwicklung erfolgte in Normalkammern mit Kammersättigung (20 min) über eine Laufhöhe von 10 bis 15 cm. Nachfolgende Fließmittelgemische und Detektionsmittel wurden verwendet.

Tab. 36: Fließmittelgemische der Dünnschichtchromatographie

	Fließmittelgemisch	Verhältnis
FM I:	n-Hexan/ Ethylacetat	80:20
FM II:	Ethylacetat/Ethanol/1,4-Dioxan/Cyclohexan/Ammoniak 25%	40:20:15:15:10

Tab. 37: Detektionsmittel der Dünnschichtchromatographie

	Detektionsmittel
A:	Fluoreszenzlöschung im UV ₂₅₄ -Licht
B:	2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagenz [125]
C:	Schwefelsäure, nach dem Besprühen 30 min bei 120°C erhitzen
D:	DRAGENDORFF-Reagenz, modifiziert [126]

4.4.4.2 Analytische HPLC

HPLC-Methode für Derivate der N-Methyl-4-piperidyl benzilate:

Stationäre Phase: LiChrospher 60, RP-select B, 250-4 (5 µm) (Merck)
Mobile Phase: Basen:
0,05 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 7,5/Acetonitril 60:40
Hydrochlorid der Basen:
0,05 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 2,5/Acetonitril 60:40
Fluss: 1 ml/min
Detektion: Dioden-Array-Detektor, Messbereich 200 nm bis 400 nm
Messwellenlänge: 230 nm oder 280 nm
Injektionsvolumen: 2 µl einer 1 %igen methanolischen oder isopropanolischen Lösung

HPLC-Methode für Derivate der (-)-Menthyl benzilate:

Stationäre Phase: LiChrospher 60, RP-18, 250-4 (5µm) (Merck)
Mobile Phase: Acetonitril/Wasser 70:30
Fluss: 1,5 ml/min
Detektion: Dioden-Array-Detektor, Messbereich 200 nm bis 400 nm
Messwellenlänge: 230 nm oder 280 nm
Injektionsvolumen: 2 µl einer 1 %igen methanolischen oder isopropanolischen Lösung

HPLC-Methode zur Enantiomerentrennung chiraler N-Methyl-4-piperidyl benzilate:

Stationäre Phase: Amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) (Chiralpak AD, 250-4)
Mobile Phase: n-Hexan/2-Propanol/Diethylamin 95:5:0,1 bis 75:25:0,1
oder
Methanol 100 %
Fluss: 0,7 bis 1,0 ml/min
Detektion: Dioden-Array-Detektor, Messbereich 200 nm bis 400 nm
Messwellenlänge: 230 nm oder 280 nm
Injektionsvolumen: 2 µl einer 1 %igen methanolischen oder isopropanolischen Lösung

4.4.4.3 Semipräparative HPLC

Enantiomerentrennung:

(R)-/(S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-dimethylaminobenzilat, (7/8): (R)- und (S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-dimethylaminobenzilat werden durch semipräparative HPLC-Trennung erhalten. Als chirale stationäre Phase wird Amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) (Chiralpak AD, 250 mm x 4,6 mm) verwendet. Die Trennung wird mit einem Gemisch aus n-Hexan/Isopropanol/Diethylamin (85,5:14,5:0,1) als mobiler Phase bei einem Fluss von 0,9 ml/min durchgeführt. Die Detektion erfolgt bei einer Wellenlänge von 230 nm. Die Retentionszeiten betragen für das R-Enantiomer $t_R = 14,89$ min und das S-Enantiomer $t_S = 15,87$ min. Durchführung: 25 µl einer isopropanolischen Lösung der racemischen Base

(ca. 20 mg/ml) werden pro HPLC-Lauf injiziert. Die anfallenden Fraktionen werden mit einem Fraktionensammler aufgefangen und im Vakuum eingeeengt. Nach 40 HPLC-Läufen können ca. 8 mg *R*- bzw. *S*-Enantiomer erhalten werden.

(*R*)-/(*S*)-*N*-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethoxybenzilat, (**9/10**): Die HPLC-Trennung von (*R,S*)-*N*-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethoxybenzilat erfolgt entsprechend Verbindung **7** und **8** an Amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) (Chiralpak AD, 250 mm x 4,6 mm) als stationärer Phase. Die Trennung wird mit einem Gemisch aus *n*-Hexan/Isopropanol/Diethylamin (95:5:0,1) als mobiler Phase bei einem Fluss von 1 ml/min durchgeführt. Die Detektion erfolgt bei einer Wellenlänge von 230 nm. Die Retentionszeiten betragen für das *R*-Enantiomer $t_R = 13,03$ min und das *S*-Enantiomer $t_S = 10,48$ min. Durchführung: s. Verbindung **7** und **8**.

Diastereomerentrennung:

(-)-Menthyl 3,4-dimethoxybenzilate werden unter folgenden Bedingungen getrennt:

Stationäre Phase: LiChrospher RP-18, 250-10 (7 μ m)
Mobile Phase: Acetonitril/Wasser 50:50
Fluss: 3,0 ml/min
Detektion: UV-Detektor, Messwellenlänge 280 nm
Injektionsvolumen: 100 μ l

4.4.4.4 Präparative Säulenchromatographie

Zur Präparativen Säulenchromatographie werden durchschnittlich für ca. 1 g zu trennendes Gemisch 100 g Kieselgel verwendet. Das Kieselgel wird im jeweiligen Fließmittel aufgeschlemmt und in eine Chromatographiesäule (25 cm, d = 1 cm; 30 cm, d = 3 cm oder 50 cm, d = 1 cm) eingefüllt. Die Fraktionen werden jeweils bei ca. 20 bis 30 ml und einer Tropfgeschwindigkeit von 10-15 Tropfen/min gewechselt.

SC-Methode für Derivate der (-)-Menthyl benzilate, (-)-8-Phenylmenthyl benzilate, Methyl benzilate:

Stationäre Phase: Kieselgel 60, 0,063-200 μ m (70-230 mesh ASTM)
Fließmittel: *n*-Hexan/Ethylacetat 9:1 bis 3:7

SC-Methode für Derivate der für Derivate der 4-Piperidyl benzilate:

Stationäre Phase: Kieselgel 60, 0,063-200 μ m (70-230 mesh ASTM)
Fließmittel: Dichlormethan/ammoniakalisch gesättigtes Methanol 9:1

4.4.5 Polarimetrie

Die polarimetrischen Untersuchungen wurden in Küvetten mit 1,2 ml Füllvolumen und einer Länge von 1,00 dm durchgeführt. Dazu wurden methanolische oder ethanolische Lösungen der enantiomeren Benzilate hergestellt. Vermessen wurde bei der Natrium-D-

Linie und einer Temperatur von 20°C. Die Integrationszeit (Zeit pro Registrierung) betrug 5 s. Aus zehn Einzelmessungen wurde der Mittelwert bestimmt und α_D^{20} berechnet.

4.4.6 Circulardichroismus (CD) und Optische Rotationsdispersion (ORD)

Zur Aufnahme der CD-Spektren wurden methanolische Lösungen (HPLC-Qualität) der enantiomeren Verbindungen in Konzentrationen von 10^{-4} bis 10^{-5} mol/l hergestellt. Die methanolischen Lösungen und das reine Lösungsmittel wurden in Zellen mit einer Zellenlänge von 0,1 oder 0,2 cm und bei einem Wellenlängenbereich von 200 bis 400 nm vermessen. Der Mittelwert aus 3 Messungen je Probe wurde ermittelt.

Datenverarbeitung: Mit dem Software-Programm J-700, Version 1.50.01 (Jasco) wurden die Lösungsmittelspektren von den CD-Spektren der Enantiomere abgezogen. Die CD-Spektren wurden Rausch reduziert (noise reduction) und geglättet (Smoothing). Anschließend wurde die molare Elliptizität unter Berücksichtigung der Konzentration und Zellenlänge errechnet. Auf Grundlage der Kronig-Kramer-Gleichung (Beziehung zwischen Absorption und Refraktion) wurden aus den CD-Spektren durch K/K (Kronig/Kramer) - Konversion die ORD-Spektren erhalten.

4.4.7 Kapillarelektrophorese

Die Kapillaren werden auf die benötigte Länge mit einem Keramik-Plättchen zugeschnitten. Das Detektorfenster wird eingebrannt und mit Methanol gereinigt.

Trennbedingungen:

Quarzkapillare (fused silica):	Länge: 43/60 cm Innendurchmesser: 50 μ m
Chiraler Zusatz:	4,5 mg/ml Carboxymethyl- β -CD (Na-Salz)
Puffer:	100 mM NaH_2PO_4 , pH=2,3
Spannung/ Temperatur:	13 kV/ 25 °C
Detektion:	UV-Detektor, 281 nm

4.5 Enzymatische Untersuchungen

Allgemeine Arbeitsvorschrift. Das Substrat wird in dem angegebenen Medium im Ultraschallbad suspendiert und anschließend mit dem jeweiligen Enzym versetzt. Der Ansatz wird zunächst 1 h geschüttelt und dann bei 37°C inkubiert. Es werden kontinuierlich Proben (100 μ l) zu folgenden Zeiten entnommen: 1 h (Raumtemperatur, geschüttelt), 16 h (37°C), 20 h (37°C), 33 h (37°C), 65 h (37°C), 85 h (37°C), 100 h (37°C), 120 h (37°C).

Aufarbeitung der Proben. Zur Extraktion der neutralen, sauren und basischen Substrate und Produkte werden die Proben mit Diethylether im sauren, neutralen und basischen Milieu extrahiert. Die organischen Phasen werden vereint und abgedampft. Durch dünnschichtchromatographische Methoden (FM I oder FM II, Detektion: Schwefelsäure) wird die enzymatische Umsetzung verfolgt. Für die Ermittlung der Enantioselektivität wird

der Rückstand in Methanol aufgenommen und mittels HPLC (Chiralpak AD, mobile Phase *n*-Hexan/2-Propanol/Diethylamin) untersucht (Kap. 3.1.4.1, Tab. 11).

Methode a, Veresterung:

Substrat: (*R,S*)-3,5-Dimethoxybenzilsäure (**90**)
(*R,S*)-3-Methoxybenzilsäure (**89**)
Substratmenge: 4 mg
Enzym (units/mg Substrat): PLE (90)
CCL (35)
PCL (40)
PPL (100)
Suspensionsmedium: 0,5 ml Toluol
Sonstige Zusätze: 2 Äqu. *n*-Butanol

Methode b, enzymkatalysierte Hydrolyse:

Substrat: (*R,S*)-Methyl 4-methylsulfonylbenzilat (**71**)
(*R,S*)-Methyl 3-methoxybenzilat (**69**)
(*R,S*)-Methyl 3,5-dimethoxybenzilat (**91**)
(*R,S*)-Methyl 4-trifluormethylbenzilat (**68**)
Substratmenge: 2 mg
Enzym (units/mg Substrat): PLE (40)
Suspensionsmedium: 0,5 ml Phosphatpuffer pH 7,4

Methode c, enzymkatalysierte Hydrolyse:

Substrat: (*R,S*)-*N*-Methyl-4-piperidyl 4-*tert*-benzilat (**72**)
(*R,S*)-*N*-Methyl-4-piperidyl 4-methylsulfonylbenzilat (**80**)
(*R,S*)-*N*-Methyl-4-piperidyl 3,5-dimethoxybenzilat (**78**)
(*R,S*)-*N*-Methyl-4-piperidyl 4-dimethylaminobenzilat (**75**)
(*R,S*)-*N*-Methyl-4-piperidyl 4-butoxybenzilat (**74**)
(*R,S*)-*N*-Methyl-4-piperidyl 4-butylbenzilat (**73**)
(*R,S*)-*N*-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethylbenzilat (**77**)
(*R,S*)-*N*-Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethoxybenzilat (**76**)
(*R,S*)-*N*-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (**79**)
Substratmenge: 2 mg
Enzym (units/mg Substrat): PLE (40)
Suspensionsmedium: 0,5 ml Phosphatpuffer pH 7,4

Methode d, enzymkatalysierte Hydrolyse:

Substrat: (*R,S*)-*N*-Methyl-3-piperidyl 3-methoxybenzilat (**95**)
(*R,S*)-*N*-Methyl-3-piperidyl 3,5-dimethoxybenzilat (**96**)
Substratmenge: 2 mg
Enzym (units/mg Substrat): PLE (40)
Suspensionsmedium: 0,5 ml Phosphatpuffer pH 7,4

Methode e, enzymkatalysierte Hydrolyse:

Substrat: (*R,S*)-*N*-Methyl-4-piperidyl *O*-acetoxy-3-methoxybenzilat (**88**) (Synthese s. u.)
Substratmenge: 2 mg
Enzym (units/mg Substrat): PLE (40)

Suspensionsmedium: 0,5 ml Phosphatpuffer pH 7,4

Methode f, enzymkatalysierte Veresterung:

Substrat: (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat (**79**)

Substratmenge: 5 mg

Enzym (units/mg Substrat): PLE (40)

CCL (20)

PCL (50)

PPL (500)

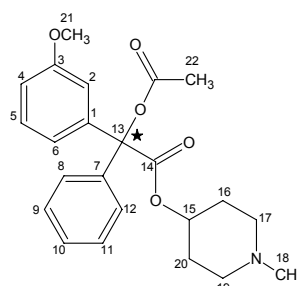
Suspensionsmedium: 0,5 ml Toluol

Sonstige Zusätze: 1 Äqu. Acetanhydrid

(R,S)-N-Methyl-4-piperidyl O-acetoxy-3-methoxybenzilat, **88**

C₂₃H₂₇NO₅

M_r: 397,46 g/mol



Synthese: Eine Mischung aus 5 mmol N-Methyl-4-piperidyl 3-methoxy benzilat HCl, 10 ml Essigsäureanhydrid und 2 g frisch geschmolzenem Natriumacetat werden für 2 h bei 150-160°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird mit Wasser verdünnt und mit Ammoniumhydroxid ein basischer pH-Wert eingestellt. Anschließend wird mit Diethylether extrahiert. Die organische Phase wird über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingeeengt (modifiziert nach CHENEY [127]).

Ausbeute: 23 % d.Th.

¹H-NMR: δ_H [ppm] (300 MHz, CDCl₃, TMS): 1,65 m (2H, CH₂, C-17, C-19); 1,83 m (2H, CH₂, C-17, C-19); 2,11 s (3H, CH₃, C-18); 2,22 m (7H, CH₃, C-23, CH₂, C-16, C-20); 3,70 s (3H, C-21); 4,84 m (1H, CH, C-15); 6,76 m (1H, sAr-H, C-4); 7,01-7,49 m (8H, sAr-H, C-2, C-5, C-6, Ar-H, C-8 bis C-12)

¹³C-NMR: δ_C [ppm] (75 MHz, CDCl₃, TMS): 21,3 (C-23); 29,9 (C-16, C-20); 45,9 (C-18); 52,1 (C-17, C-19); 55,2 (C-21); 113,1 (C-2); 113,9 (C-4); 120,0 (C-6); 127,8 (C-8, C-12); 127,8 (C-9 bis C-11); 128,9 (C-5); 139,7 (C-1); 141,4 (C-7); 159,1 (C-3); 168,2 (C-22); 169,1 (C-14)

4.6 Radioligand-Bindungsstudien an Muscarinrezeptoren

Zellkulturen: CHO-Zellen, welche hM₁-, hM₂- und hM₃-Rezeptoren exprimieren

[³H]-NMS-Bindung: Das CHO-Zellhomogenat wurde so verdünnt, dass eine Konzentration von etwa 0,05 bis 0,1 nM Muscarinrezeptor in den Bindungsstudien vorlag. In Anwesenheit von [³H]-NMS und der entsprechenden Konzentration unmarkierten Benzilates in 1,0 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4), angereichert mit 2 mM Magnesiumchlorid, wurde das Zellhomogenat bei 25°C inkubiert. Die nichtspezifische Bindung wurde durch Bindung von 10 µM Atropin bestimmt. Die Konzentration des Isotopenindikators betrug 0,25 nM für die Kompetitionskurven von M₁- und M₂-Rezeptoren und 1,0 nM für den M₃-Rezeptor. Um die Affinität des Isotopenindikators an diesen Rezeptoren zu verifizieren, wurden Sättigungskurven durch Variation der [³H]-NMS-Konzentration (0,05 bis 4,0 nM) aufgenommen. Inkubationszeiten von 2 h für die Inkubation mit M₁- und M₂-Rezeptor bzw. 4 h für den M₃-Rezeptor waren ausreichend, um ein Gleichgewicht der Bindung des Isotopenindikators zu erreichen. Im Anschluss an die Inkubation wurde eine Filtration über Glassinterfilter C (K-LAB), welche mit 0,01 % Polyethylenimin vorbehandelt wurden, durchgeführt, um die unspezifische Bindung zu reduzieren. Die Filter wurden 3mal mit 2 ml eiskaltem 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) gewaschen und mindestens 4 h in Lumagel Plus (Lumac Lsc.) eingeweicht. Die Radioaktivität wurde mit einem Flüssig-Scintillationszähler (Packard 1500 Tricarb liquid scintillation analyser) ermittelt.

Datenanalyse: Die Kompetitionskurven wurden aus den experimentellen Daten durch nichtlineare Regression (Software: Graph Pad) erstellt. Die K_i-Werte der untersuchten Verbindungen wurden unter der Annahme, dass die [³H]-NMS-Bindung kompetitiv inhibiert wird, mithilfe der CHENG- und PRUSOFF-Gleichung berechnet. Die pK_i-Werte und Standardabweichungen sind in Tab. 23 (Kap. 3.4.1) zusammengefasst.

Die Rezeptor-Radioligand-Bindungsstudien an Muscarinrezeptoren wurden von Frau Waelbroeck (Faculte de Médecine, Laboratoire de Chimie Biologique et de la Nutrition, Brüssel) durchgeführt.

5 Zusammenfassung

Die Racemate basischer N-Methyl-4-piperidyl benzilate sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, die deren Synthese und Wirkprofil zum Inhalt haben [3, 5]. Wie sich die pharmakologische Gesamtwirkung des Racemates aus den Einzelwirkungen der Enantiomere zusammensetzt, wurde bislang nicht erforscht und wird im Rahmen dieser Arbeit anhand der antimuscarinergen Wirkung erstmals untersucht. Hierzu wurden neue und in der Literatur nicht beschriebene enantiomere N-Methyl-4-piperidyl benzilate (**1** bis **18**) auf verschiedenartigen Wegen (stereoselektive Synthese, fraktionierte Kristallisation und chromatographische Methoden) in guter enantiomerer Reinheit hergestellt und analytisch charakterisiert. Bis auf wenige Ausnahmen lassen sich die Enantiomere der N-Methyl-4-piperidyl benzilate in sechs Synthesestufen durch stereoselektive Synthese darstellen. Schwierigkeiten treten dann auf, wenn instabile Zwischenprodukte wie substituierte Phenylglyoxylsäuren anfallen und nachfolgende Reaktionen nicht durchführbar sind. Alternativ können die Enantiomere durch fraktionierte Kristallisation mit Weinsäurederivaten gewonnen werden. Von Vorteil erwies sich dabei das Arbeiten mit einer Mischung aus Weinsäurederivaten nach einer modifizierten Methode von VRIES, mit der die Anzahl der Kristallisationszyklen bedeutend verringert werden konnte. Die Vorzugskristallisation, deren Grundlage PASTEUR 1848 per Zufall bei Experimenten mit Weinsäuresalzen entdeckte, konnte auf die Racematspaltung von **79** übertragen werden. Die Besonderheit hierbei ist, dass sich mit einem enantiomorphen Impfkristall bevorzugt ein Enantiomer auskristallisieren lässt. Führen die bisher genannten Methoden nicht zu enantiomeren Benzilaten, können chromatographische Methoden zur Racemattrennung eingesetzt werden. Für alle Zielstrukturen wurden direkte chromatographische Methoden (chirale stationäre Phase) im analytischen Maßstab gefunden. In einigen Fällen wurden diese Methoden zur Gewinnung der Enantiomere im 10 mg Bereich genutzt. Größere Mengen (100 bis 200 mg) lassen sich besser über die diastereomeren und gut zugänglichen (-)-Menthyl benzilate an achiralen Phasen gewinnen.

Die enzymkatalysierte Umsetzung von chiralen N-Methyl-4-piperidyl benzilaten führte nicht zur erfolgreichen Racemattrennung. Es konnte zwar gezeigt werden, dass Benzilate Substrate für Schweineleberesterase (PLE) darstellen. Jedoch reicht die Enantioselektivität des Enzyms nicht aus, um Enantiomere in der gewünschten optischen Reinheit herzustellen.

Zusammenfassend lässt sich zu den Darstellungsmöglichkeiten sagen, dass alle untersuchten Methoden, mit Ausnahme der enzymatischen Umsetzung, zu enantiomeren Benzilaten in hoher enantiomerer Reinheit führen. Keine Methode eignet sich generell für alle enantiomeren Zielstrukturen. Vielmehr ergänzen sich die untersuchten und eingesetzten Methoden in ihrer Anwendbarkeit.

Eine wichtige Voraussetzung für die Beurteilung der enantiomeren Reinheit der gewonnenen N-Methyl-4-piperidyl benzilate ist die analytische Charakterisierung der optischen Antipoden. Hierbei kommt den direkten (chirale stationäre Phase) und schnell durchführbaren HPLC-Methoden bei der Identifizierung der Enantiomere die größte Bedeutung zu. Die Bestimmung der optischen Drehwerte (Na-D-Linie) für die Charakterisierung enantiomerer Benzilate kann aufgrund der mitunter kleinen Drehwerte nur eingeschränkt eingesetzt werden. Methoden wie Circular dichroismus und Optische Rotationsdispersion, mit denen die chiroptischen Eigenschaften über einen größeren Wellenlängenbereich verfolgt werden, lassen dagegen eindeutig eine vorhandene optische Aktivität erkennen.

Problematisch gestaltet sich bei allen genannten analytischen Methoden die Bestimmung der absoluten Konfiguration der Benzilsäureester. Eine eindeutige Zuordnung zur *R*- oder *S*-Konfiguration kann nur mit einer enantiomeren Referenzsubstanz bekannter absoluter Konfiguration erfolgen. Deshalb ist es besonders bemerkenswert, dass auf Grundlage der ^1H -NMR-Spektroskopie eine Methode entwickelt wurde, mit der Aussagen zur absoluten Konfiguration des stereogenen Zentrums von Benzilsäurederivaten in Form diastereomerer (-)-8-Phenylmenthyl benzilate möglich sind. Die absolute Konfiguration des asymmetrischen C-Atoms im Benzilsäurerüst lässt sich anhand der chemischen Verschiebung der Substituentenprotonen des aromatischen Systems im ^1H -NMR-Spektrum bestimmen.

In Radioligand-Bindungsstudien wurde die Affinität acht enantiomerer Zielstrukturen an den muscarinergen Rezeptorsubtypen M_1 , M_2 und M_3 untersucht. Bestätigt wurden dabei vermutete enantiomere Aktivitätsunterschiede. Erstmals konnte in den Kompetitions-experimenten nachgewiesen werden, dass die *S*-konfigurierten Benzilate (Eutomer) im Vergleich zu den *R*-Enantiomeren (Distomer) generell höhere Affinitäten aufweisen. Alle enantiomeren Verbindungen zeigen eine M_1 -Präferenz oder -Selektivität. Die M_1 -Affinität wird durch eine *S*-Konfiguration des asymmetrischen C-Atoms gefördert, dagegen erhöht die *R*-Konfiguration die M_3 -Affinität. Diese neuen Erkenntnisse zur Stereoselektivität

chiraler N-Methyl-4-piperidyl benzilate gehen nicht mit den Beobachtungen von KIESEWETTER für 3-Chinuclidinyl benzilate einher, wonach *R*-konfigurierte Benzilsäure die M₁-Selektivität fördert, während das *S*-Enantiomer möglicherweise die M₂-Selektivität begünstigt [6]. Zudem weisen *R*-Chinuclidinyl benzilate neben einer dominierenden M₁-Affinität eine höhere M₂- als M₃-Affinität auf. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass neben der absoluten Konfiguration offenbar die Art des basischen Alkohols im Benzilsäureester die Subtypenselektivität beeinflusst. Die zentrale Frage der Untersuchungen, ob sich durch Variation der absoluten Konfiguration des stereogenen Zentrums das Wirkungsprofil von N-Methyl-4-piperidyl benzilaten modulieren lässt, kann abschließend mit den vorliegenden Resultaten beantwortet werden. So ist das *S*-Enantiomer der 4-Dimethylaminoverbindung (**8**) als M₁-selektive Verbindung anzusehen und vergleichbar mit dem als Ulkustherapeutikum eingesetzten Pirenzepin. Hingegen ist beim *R*-Enantiomer der 4-*tert*-Butyl-Verbindung (**1**) die M₃-Affinität am größten ausgeprägt und stellt einen potenziellen Arzneistoff zur Behandlung der Harninkontinenz dar.

Mit Hilfe von Molecular Modelling ist es gelungen, ein aussagekräftiges Rezeptormodell auf Grundlage der experimentellen Bindungsdaten für basische Benzilsäureester zu entwickeln. Mit dem Rezeptormodell werden die Affinitätsunterschiede enantiomerer Benzilate und deren Subtypenselektivität an den Muscarinrezeptoren umfassend erklärt.

In künftigen Arbeiten sollte auf Grundlage der vorliegenden Rezeptormodelle eine Wirkungsoptimierung enantiomerer N-Methyl-4-piperidyl benzilate durch Variation sterischer Parameter sowie der Arylsubstitution erfolgen. Wird eine M₃-Selektivität (Harninkontinenz) angestrebt, sollte dabei von *R*-konfigurierten Benzilaten ausgegangen werden. Dagegen sind *S*-konfigurierte Benzilate als Leitstruktur zu bevorzugen, um Verbindungen mit ausgeprägter M₁-Selektivität (Ulkustherapeutika) zu erhalten. Die Modifikation des basischen Alkohols im Esterrest als weitere Einflusskomponente auf die Rezeptorsubtypenselektivität sollte dabei berücksichtigt werden. Für einen möglichen therapeutischen Einsatz chiraler N-Methyl-4-piperidyl benzilate als Antiparkinsonika sind die Auswirkungen der räumlichen Struktur von chiralen Benzilaten auf die dopaminerge Wirksamkeit genauer zu betrachten.

Literaturverzeichnis

- 1 Roth, H., J.: Dex-, Lev-, Es-, eine Bilanz der letzten fünf Jahre; Deutsche Apothekerzeitung; 2004, **144** (20), S. 57-64
- 2 Auterhoff, H., Knabe, J., Höltje, H.-D.: Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie; 13. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1994
- 3 Vorwerk, Th., Fröhlich, L., Göber, B.: Benzilates - A Review of Their Actions, Synthesis and Properties; Die Pharmazie; 2001, **56** (8), S. 595-609
- 4 Morgenstern, E.: Forschungsbericht (Entwicklung neuer Arzneimittel zur Behandlung des Parkinson-Syndroms), Berlin 1991, über Pharmakologische Forschungsgesellschaft Biopharm GmbH Berlin
- 5 Vorwerk, Th.: Dissertation: Untersuchungen zu Synthese, Analytik, Stabilität und Pharmakologie neuer substituierter Piperidylbenzilate; Humboldt-Universität zu Berlin, 2000
- 6 Kiesewetter, D., O., Silverton, J., V., Eckelman, W., C.: Syntheses and Biological Properties of Chiral Fluoroalkyl Quinuclidinyl Benzilates; J. Med. Chem.; 1995, **38**, S. 1711-1719
- 7 Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H., K., Schäfer-Korting, M.: Arzneimittelwirkungen-Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie; 8. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2001
- 8 Battock, T., M., Castelden, C., M.: Pharmacological Treatment of Urinary Incontinence; Brit. Med. Bull.; 1990, **46** (1), S. 147-155
- 9 a) Chapple, C.: Muscarinic Receptor Antagonist in the Treatment of Overactive Bladder; Urology; 2000, **55**, S. 33-46
b) Eglen, R., Watson, N.: Selective Muscarinic Agonists and Antagonists; Pharmacology & Toxicology, 1996, **78**, S. 59-68
- 10 Bierwisch, Michael: Dissertation: Synthese und Charakterisierung neuer potentieller M₃-selektiver Anticholinergika mit Diphenylelessigsäurestruktur zur Therapie der Harninkontinenz; Humboldt-Universität zu Berlin, 2002
- 11 Adam, O., Dörfler, H., Forth, W.: Ulzera im oberen Magen-Darm-Trakt-Pharmakologische Grundlagen der Behandlung; Deutsches Ärzteblatt, 2001, **98** (13), S. A840
- 12 Müller, C., E., Hubert, M., A., Mayer, R.: Parkinson-Therapeutika; Deutsche Apothekerzeitung; 2002, **142** (38), S. 53-64
- 13 Franke, S.: Lehrbuch der Militärchemie; Band 1, 2. Auflage, Berlin, Militärverlag der Deutschen Demokratischen Republik, 1977, S. 207-214
- 14 McKenzie, A.: Studies in Asymmetric Synthesis. I. Reduction of Menthyl Benzoylformate. II. Action of Magnesium Alkyl Haloids on Menthyl Benzoylformate; J. Chem. Soc.; 1904, **85**, S. 1249

- 15 Prelog, V.: Untersuchungen über asymmetrische Synthesen I. Über den sterischen Verlauf der Reaktion von α -Ketosäureestern optisch aktiver Alkohole mit Grignard'schen Verbindungen; *Helv. Chim. Acta*; 1953, **36**, S. 308
- 16 Fiaud, J., C.: Prelog's Methods in Kagan, H., B.: *Fundamentals and Methods of Stereochemistry*; Band 3, Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 1977, S. 19
- 17 Meyers, A., I., Slade, J.: Asymmetric Addition of Organometallics to Chiral Ketooxazolines. Preparation of Enantiomerically Enriched α -Hydroxy Acids; *J. Org. Chem.*; 1980, **45**, S. 2785-2791
- 18 Ashby, E., C. and Reed, R.: A Method for the Preparation of Grignard Compounds in Hydrocarbon Solution; *J. Org. Chem.*; 1966, **31**, S. 971
- 19 Senanayake, C., H., Fang, K., Grover, P., Bakale, R., P., Vandenbossche, C., P., Wald, S., A.: Rigid Aminoalcohol Backbone as a Highly Defined Chiral Template for the Preparation of Optically Active Tertiary Hydroxyl Acids; *Tetrahedron Lett.*; 1999, **40**, S. 819-822
- 20 Boireau, G., Deberly, D., A.: Synthèse D' α -Hydroxyacides Optiquement Actifs par Addition D'Organozinciques sur le Phenylglyoxylat de (-) Menthyle; *Tetrahedron*; 1989, **45** (18), S. 5837-5844
- 21 Whitesell, J., K.: New Perspectives in Asymmetric Induction; *Acc. Chem. Res.*; 1985, **18**, S. 280-284
- 22 Corey, E., J., Ensley, H., E.: Preparation of an Optically Active Prostaglandin Intermediate via Asymmetric Induction; *J. Am. Chem. Soc.*; 1975, **97**, S. 6908
- 23 Oppolzer, W., Kurth, M., Reichlin, D., Chapuis, C., Mohnhaupt, M., Moffat, F.: Asymmetric Induction in Diels-Alder Reactions to Acrylates Derived from Chiral sec-Alcohols; *Helv. Chim. Acta*; 1981, **64**, S. 2802
- 24 Whitesell, J., K., Bhattacharya, A., Henke, K.: Asymmetric Induction. Nucleophilic Addition to a chiral Glyoxylate Ester; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*; 1982, S. 988-989
- 25 Whitesell, J., K., Lawrence, R., M., Huang-Hsing Chen: Auxiliary Structure and Asymmetric Induction in the Ene Reactions of Chiral Glyoxylates; *J. Org. Chem.*; 1986, **51**, S.4779-4784
- 26 Kiesewetter, D., O.: Asymmetric Synthesis of Benzilic Acid Analogues Using 8-Phenylmenthyl as a Chiral Auxiliary; *Tetrahedron Asymmetry*; 1993, **4** (10), S. 2183-2198
- 27 Olah, G., A., Yamato, T., Hashimoto, T., Shih, J., G., Trivedi, N., Singh, B., P., Piteau, M., Olah, J., A.: Electrophilic Nitration, Halogenation, Acylation, and Alkylation of α,α,α -Trifluoromethoxybenzene; *J. Am. Chem. Soc.*; 1987, **109**, S. 3708-3713
- 28 Sheppard, W., A.: Aryl fluoroalkyl Ethers and Sulfides: Evidence for Sulfur d-Orbital Interaction; *J. Am. Chem. Soc.*; 1961, **83**, S. 4860-4861
- 29 Pelzer, R., Scharf, H.-D., Buschmann, H., Runsink, J.: Derivate der (+)-Menthylglyoxylate in der Paternó-Büchi-Reaktion. Einfluß von Substituenten im Glyoxylsäurerest auf die Diastereoselektivität; *Chem. Ber.*; 1989, **122**, S. 1187-1192

- 30 Ottenheijm, H., C., J., De Man, J., H., M.: Syntheses of α -Keto Acid Chlorides; Synthesis; 1975, S. 163-164
- 31 Ying K., Y., Tebbe, A., L., Linebarger, J., H., Beight, D., B., Craft, T., J., Gifford-Moore, D., Goodson, Th., Herron, D., K., Klimkowski, V., J., Kyle, J., A., Sawyer, J., S., Smith, G., F., Tinsley, J., M., Towner, R., D., Weir, L., Wiley, M., R.: N2-Aroylanthranilamide Inhibitors of Human Factor Xa; J. Med. Chem.; 2000, **43**, S. 873-882
- 32 Pailer, M., Bergthaller, P.: O-Alkylierung von Phenolen und Carbonsäuren mit Dialkylsulfaten und Alkyltosylaten in Dimethylformamid; Monatsh. Chem.; 1968, **99**, S. 103-111
- 33 Scheithauer, S.: Synthese einiger Metabolite des Blasenspasmodolytikums Propiverinhydrochlorid; Pharmazie; 1988, **43**, S. 86
- 34 Ashby, E., C., Al-Fekri, D., M. : The Reaction of Benzotrihalides and Benzal Halides with Magnesium. Synthetic and Mechanistic Studies; J. Organomet. Chem.; 1990, **390**, S. 275-292
- 35 Collet, A.: Separation and purification of enantiomers by crystallisation methods; Enantiomer; 1999, **4**, S. 157
- 36 Eliel, E., L., Samuel, H., W.: Basic Organic Stereochemistry; New York, Wiley-Interscience, 2001
- 37 Collet, A., Brienne M.-J., Jacques J.: Optical Resolution by Direct Crystallization of Enantiomer Mixtures; Chemical Reviews; 1980, **3**, S. 215-230
- 38 Meyer, H.: Di-anisoyl-d-weinsäure in: Rabe, P.: Über die Reduktion der China-Ketone zu China-Alkoholen und über die sterische Umlagerung der China-Alkaloide; Justus Liebigs Ann. Chem.; 1932, **492**, S. 265-266
- 39 Vries, T., Wynberg, H., van Echten, E., Koek, J., ten Hoeve, W., Kellogg, R., M., Broxterman, Q., B., Minnaard, A., Kaptein, B., van der Sluis, S., Hulshof, L., Kooistra, J.: Racematspaltung mit Substanzfamilien; Angew. Chem.; 1998, **110** (17), S. 2491-2496
- 40 Cohen, V., I., Rzeszutarski, W., J., Gibson, R., E., Fan, L., H., Reba, R., C.: Preparation and Properties of (R)-(-)-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl-(R)-(+)- α -hydroxy- α -(4-[¹²⁵I]iodophenyl)- α -phenyl Acetat and (R)-(-)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl-(S)-(-)- α -hydroxy- α -(4-[¹²⁵I]iodophenyl)- α -phenyl Acetate as Potential Radiopharmaceuticals]; J. Pharm. Science; 1989, **78**, S. 833-836
- 41 Pasteur, L.: Ann. Chim. Phys.; 1848, **24**, S. 442
- 42 Jacques, J., Collet, A.: Enantiomers, Racemates and Resolutions; New York, Wiley, 1981
- 43 Li, J., Z., Grant, D., J., W.: Effects of excess enantiomer on the crystal properties of a racemic compound: ephedrinium 2-naphthalenesulfonate; Int. J. Pharm.; 1996, **137**, S. 21-31
- 44 Jacques, J., Leclercq, M., Brienne, M.-J.: La Formation de Sels Augmente-T-Elle La Fréquence des Débroulements Spontanés?; Tetrahedron; 1981, **37**, S. 1727

- 45 van der Haest, A., D., Wynberg, H.: Towards a rational design of resolving agents. Part IV. Crystal packing analyses and molecular mechanics calculations for five pairs of diastereomeric salts of ephedrine and a cyclic phosphoric acid; Recl. Trav. Chim. Pays-Bas; 1992, **111**, S. 111-118
- 46 Gould, R., O., Gray, A., M., Taylor, P., Walkinshaw, M., D. : Crystal Environments and Geometries of Leucine, Isoleucine, Valine, and Phenylalanine Provide Estimates of Minimum Nonbonded Contact and Preferred van der Waals Interaction Distances; J. Am. Chem. Soc.; 1985, **107**, S. 5921-5927
- 47 Okamoto, Y., Yashima, E.: Chromatographische Enantiomerentrennung an Polysaccharidderivaten; Angew. Chem.; 1998, **110**, S. 1072-1095
- 48 Yashima, E., Okamoto, Y.: Chiral Discrimination on Polysaccharides Derivatives; Bull. Chem. Soc. Jpn.; 1995, **68**, S. 3289-3307
- 49 Wainer I., W., Stifflin, R., M., Ya-Quin Chu: Drug Analysis using High-Performance Liquid Chromatographic (HPLC) - Chiral Stationary Phases: Where to Begin and which to use, in: Stevenson, D., Wilson, I., D.: Chiral Separations, London, Plenum Press, 1988, S. 11-21
- 50 Okamoto, Y., Kawashima, M., Hatada, K.: Chromatographic Resolution: XI: Controlled Chiral Recognition of Cellulose Triphenylcarbamate derivatives Supported on Silica Gel; J. Chrom. A; 1986, **363**, S. 173-186
- 51 Daicel Chemical Industries, LTD.: Application Guide for chiral column selection; Second Edition, Tokyo
- 52 Okamoto, Y., Aburatani, R., Kaida, Y.: Chem. Lett.; 1988, S. 1125
- 53 Blaschke, G.: Substituted Polyacrylamides as Chiral Phases for the Resolution of Drugs in Zief, M., Crane, L., J.: Chromatographic Chiral Separations, Chapt. 7, New York, Dekker, 1988
- 54 Han, S., M., Armstrong, D., W.: HPLC-separation of enantiomers and other isomers with cyclodextrin-bonded phases: rules for chiral recognition in Krstulovic, A., M.: Chiral Separations by HPLC-applications to pharmaceutical compounds; Chichester, Ellis Horwood Limited, 1989, S. 208
- 55 Wainer, I., W. (Hrsg.): Drug Stereochemistry; 2. Auflage, New York, Basel, Hong Kong, Dekker, 1993, S. 154
- 56 Feitsma, K., G., Drenth, B., F., H.: A Note on Separation of Enantiomers of Oxyphenonium Bromide by High-Performance Liquid Chromatography, in: Stevenson, D., Wilson, I., D.: Chiral Separations, London, Plenum Press, 1988, S. 38, 39
- 57 Feitsma, K., G., Drenth, B., F., H., De Zeeuw, R., A.: Comparison of two β -cyclodextrin bonded stationary phases for high-performance liquid chromatography: Elution order and optical purity of enantiomers of cyclohexylphenylglycolic acid; J. Chromatogr., 1987, **387**, S. 447-452
- 58 Rücker, G., Neugebauer, M., Willems, G., G.: Instrumentelle pharmazeutische Analytik; 3. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2001

- 59 Meyers, A., I., Slade, J.: Resolution of α -Substituted Mandelic Acids via Chiral Oxazolines Using Pressurized Chromatography; *J. Org. Chem.*; 1980, **45**, S. 2912-2914
- 60 Eyrich, B.: Dissertation: Untersuchungen zur Biotransformation neuer substituierter Piperidyl benzilate; Humboldt-Universität zu Berlin, 2001
- 61 Dreßler, K.: Dissertation: Analytik, Stabilität und Biotransformation (Ratte) von Propiverinhydrochlorid (Mictonorm®) und Benzilsäure[1-methylpiperidiny-(4)]ester; Humboldt-Universität zu Berlin, 1987
- 62 Göber, B., Dressler, K., Franke, P.: Zur Biotransformation von Propiverinhydrochlorid (Mictonorm®) bei der Ratte; *Die Pharmazie*, 1988, **43**, S. 96-98
- 63 Persichetti, R., A., Lalonde, J., J., Govardhan, C., P., Khalaf, N., K., Margolin, A., L.: Candida Rugosa Lipase: Enantioselectivity Enhancements in Organic Solvents; *Tetrahedron Letters*; 1996, **37** (36), S. 6507-6510
- 64 Colton, I., J., Ahmed, S., N., Kazlauskas, R., J.: A 2-Propanol Treatment Increases the Enantioselectivity of Candida rugosa Lipase towards Esters of Chiral Carboxylic Acids; *J. Org. Chem.*; 1995, **60**, S. 212-217
- 65 Gupta, A., K., Kaslauskas, J.: Substrate Modification to Increase the Enantioselectivity of Hydrolases. A Route to Optically-Active Cyclic Allylic Alcohols; *Tetrahedron Asymmetry*; 1993, **4** (5), S. 879-888
- 66 Lefker, B., A., Hada, W., A.: An efficient synthesis of enantiomerically enriched aryllactic esters; *Tetrahedron Lett.*; 1994, **35**, S. 5205-5208
- 67 Basavaiah, D., Krishna, P., R.: Synthesis of Chiral α -Aryl- α -Hydroxyacetic Acids: Substituent Effects in Pig Liver Acetone Powder (PLAP) Induced Enantioselective Hydrolysis; *Tetrahedron*; 1995, **51**, S. 2403-2416
- 68 Drioli, S., Felluga, F.: Synthesis of (+)- and (-)-trans-tetrahydro-5-oxo-2-pentylfuran-3-carboxylic acid, precursors of (+)- and (-)-methylenolactocin; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*; 1996, S. 1289-1290
- 69 Bornscheuer, U., T., Kazlauskas, R., J.: *Hydrolases in Organic Synthesis*; Weinheim, New York, Wiley-VCH Verlag GmbH, 1999
- 70 Li-Ming Zhu, Tedford, M., C.: Application of Pig Liver Esterase (PLE) in Asymmetric Synthesis; *Tetrahedron*; 1990, **46** (19), S. 6587-6611
- 71 Frey, P., A.: *Mechanisms of Enzymatic Reactions: Stereochemistry*; New York, Elsevier, 1986, S. 3
- 72 Moorlag, H., Kellogg, R., M.: PLE catalyzed hydrolyses of α -substituted α -hydroxy ester: The influence of the substituents; *Tetrahedron Asymmetry*; **2** (7), 1991, S. 705-720
- 73 Davis, B., G., Boyer, V.: Biocatalysis and enzymes in organic synthesis; *Nat. Prod. Rep.*; 2001, **18**, S. 618-640

- 74 Davies, A., G., Ebeid, F., M.: The Resolution and Reactions of Tertiary Alcohols: Two Disubstituted Glycollic Acids and the Corresponding Disubstituted Glycols; J. Chem. Soc.; 1957, S. 3154-3155
- 75 Berova, N., Nakanishi, K., Woody, R., W.: Circular Dichroismus – Principles and Applications; 2. Auflage, New York, Wiley-VCH, 2000
- 76 Purdie, N., Brittain, H., G.: Analytical Applications of Circular Dichroism, Amsterdam, Elsevier, 1994
- 77 Pickard, S., T., Smith, H., E.: Optically Active Amines. 34. Application of the Benzene Chirality Rule to Ring-Substituted Phenylcarbinamines and Carbinols; J. Am. Chem. Soc.; 1990, **112**, S. 5741-5747
- 78 Stanchev, St., Rakovska, R., Berova, N., Snatzke, G.: Synthesis, Absolute Configuration and Circular Dichroism of Some Diarylmethane Derivatives; Tetrahedron Asymmetry; 1995, **6** (1), S. 183-198
- 79 Harada, N., Watanabe, M., Kuwahara, S., Sugio, A., Kasai, Y., Ichikawa, A.: 2-Methoxy-2-(naphthyl)propionic acid, a powerful chiral auxiliary for enantioresolution of alcohols and determination of their absolute configurations by the ¹H-NMR anisotropy method; Tetrahedron Asymmetry; 2000, **11**, S. 1249-1253
- 80 Kosaka, M., Sugito, T., Kasai, Y., Kuwahara, S., Watanabe, M., Harada, N., Job, G., E., Shvet, A., Pirkle, W.: Enantioresolution and Absolute Configuration of Chiral meta-Substituted Diphenylmethanols as Determined by X-Ray Crystallographic and ¹H NMR Anisotropy Methods; Chirality; 2003, **15**, S. 324-328
- 81 Engelhardt, H., Beck, W., Schmitt, Th.: Kapillarelektrophorese-Methoden und Möglichkeiten, Braunschweig/Wiesbaden, Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, 1994, S. 134
- 82 Rogan, M., M., Altria, K., D., Goodall, D., M.: Enantioselective separations using capillary electrophoresis; Chirality, 1994, **6**, S. 25-40
- 83 Nishi, H., Terabe, S.: Optical Resolution of drugs by capillary electrophoretic techniques; J. Chromatogr. A, 1995, **694**, S. 245-276
- 84 Rickard, E., C., Bopp, R., J., Skancy, D., J., Chetwyn, K., L., Pahlen, B., Stobaugh, J., F.: Role of capillary electrophoresis methods in the drug development process; Chirality, 1996, **8**, S. 108-121
- 85 Heuermann, M., Blaschke, G.: Chiral separation of basic drugs using cyclodextrins as chiral pseudo-stationary phases in capillary electrophoresis; J. Chromatogr., 1993, **648**, S. 267-274
- 86 Fanali, S.: Separation of optical isomers by capillary zone electrophoresis based on host-guest complexation with cyclodextrins; J. Chromatogr., 1989, **464**, S. 441-446
- 87 Snopek, J., Soini, H., Novotny, N., Smolkova-Keulemansova, E., Jelinek, I.: Selected applications of cyclodextrin selectors in capillary electrophoresis; J. Chromatogr., 1991, **559**, S. 215-222
- 88 Terabe, S., Ozaki, H., Otsuka, K., Ando, T.: Electrokinetic chromatography with 2-O-carboxymethyl- β -cyclodextrin as a moving "stationary" phase: J. Chromatogr., 1985, **332**, S. 211-217

- 89 Eliel, E., L., Samuel, H., W.: Stereochemistry of Organic Compounds; New York, Wiley, 1994
- 90 Reist, M., Testa, B., Carrupt, P.-A., Jung, M., Schurig, V.: Racemization, Enantiomerization, Diastereomerization, and Epimerization: Their Meaning and Pharmacological Significance; Chirality; 1995, **7**, S. 396-400
- 91 Dao, L., H., Maleki, M., Hopkins, C., Lee-Ruff, E.: α -Carbonyl Carbocations. 4. NMR Detection and Reactivities of Diaryl α -Carbonyl Cations; J. Am. Chem. Soc.; 1986, **108**, S. 5237-5242
- 92 Murr, B., L., Feller, L., M.: Stereochemistry of Trityl Compounds. IV. The Optical Rotation of an Asymmetric Carbonium Ion and Microscopic Reversibility in Carbonium Ion Reactions; J. Am. Chem. Soc.; 1968, **90**, S. 2966
- 93 Cheng, Y.-C., Prusoff, W.: Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction; Biochem. Pharmacol., 1973, **22**, S. 3099-3108
- 94 Karlson, P.; Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, 13. Auflage, Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag, 1988
- 95 Hölting, H.-D., Folkers, G.: Molecular Modeling; Band 5, Weinheim, VCH, 1997
- 96 Böhm, H.-J., Klebe, G., Kubinyi, H.: Wirkstoffdesign, 1. Auflage, Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Nachdruck 2002
- 97 Gether, U.: Uncovering Molecular Mechanisms Involved in Activation of G-Protein-Coupled Receptors; Endocrine Review, 2000, **21** (1) S. 90-113
- 98 Campagne, F. and Maigret, B (Laboratoire de Chimie Théorique de Nancy, U.A. CNRS 510, B.P. 239 - 54506 Vandoeuvre-les-Nancy CEDEX, France) and Bernassau, J., M. (Sanofi Recherche, 371, Rue du Pr. Blayac, 34184 Montpellier CEDEX 4, France): Snake-like Diagram of M_1 -Receptor
- 99 Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C., A., Motoshima, H., Fox, B., A., Le Trong, I., Teller, D., C., Okada, T., Stenkamp, R., E., Yamamoto, M., Miyano, M.: Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor; Science; 2000, **289**, S. 739-745
- 100 Hulme, E., C., Lu, Z., L.: Structure and activation of muscarinic acetylcholine receptors; Biochem. Soc. Trans.; 2003, **31**, S. 29-34
- 101 Schwartz, T., W., Gether, U.: Molecular mechanism of action of non-peptide ligands for peptide receptors; Curr. Pharm. Design; 1995, **1**, S. 325-342
- 102 Schwartz, T.: Vortrag: Structure-based drug discovery in 7TM receptors based on knowledge on molecular mechanism of activation; 15. März, 2004 (Erlangen)
- 103 Hulme, E., C., Curtis, C., A., M.: The Role of Charge Interactions in Muscarinic Agonist Binding, and Receptor-Response Coupling; Life Science; 1995, **56** (11/12), S. 891-898
- 104 Hulme, E., C., Lu, Z., L.: Scanning Mutagenesis Studies of the M_1 Muscarinic Acetylcholine Receptor; Receptors and Channels; 2003, **9**, S. 215-228

- 105 MOE (Molecular operating environment), Chemical Computing Group Inc., Montreal, Canada
- 106 Lu, Z., L., Curtis, C., A., M., Jones, Ph., G., Pavia, J., Hulme E., C. : The Role of the Aspartate-Arginine-Tyrosine Triad in the M₁ Muscarinic Receptor: Mutations of Aspartate 122 and Tyrosine 124 Decrease Receptor Expression but Do Not Abolish Signaling; *Mol. Pharmacol.*; 1997, **51**, S. 234-241
- 107 Clark, M., Cramer III, R., D., van Opdenbosch, N., J.: *J. Comput. Chem.*; 1989, **10**, S. 982-1012
- 108 Gasteiger, J., Marsili, M.: Iterative Partial Equalization of Orbital Electronegativity - A Rapid Access to Atomic Charges; *Tetrahedron*; 1980, **36**, S. 3219-3228
- 109 SYBYL© Tripos Associates Inc., S. L., MO; U.S.A.
- 110 Laskowski, R., A., MacArthur, M., W., Moss, D., S., Thornton, J., M.: PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures; *J. Appl. Cryst.*; 1993, **26**, S. 283-291
- 111 GOLD-Copyright-Cambridge Crystallographic Data Centre-1998-located in Cambridge, UK
- 112 Wang, R., Liang, L.: SCORE: A New Empirical Method for estimating the Binding Affinity of a Protein-Ligand Complex; *J. Mol. Model.*; 1998, **4**, S. 379-394
- 113 Flavin, M., T., Lu, M., C., Thompson, E., B., Bhargava, H., N.: Molecular modification of anticholinergics as probes for muscarinic receptors. 3. Conformationally restricted analogs of benactyzine; *J. Med. Chem.*; 1987, **30**, S. 278-285
- 114 Forth, H., Henschler, D., Rummel, W., Förstermann, U., Starke, K.: *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*; 8. Auflage, München, Urban & Fischer, 2001
- 115 Wittke, K.: Dissertation: Untersuchungen zur Synthese, Analytik und biopharmazeutischer Charakterisierung neuer basischer substituierter Benzilsäureester, Humboldt-Universität zu Berlin, 1993
- 116 Barnish, Ian, T.; Cross, Peter, E., Danilewicz, J., C., Dickonson, R., P., Stopher, D., A.: Promotion of Carbohydrate Oxidation in the Heart by Some Phenylglyoxylic Acids; *J. Med. Chem.*; 1981, **24**, S. 399-404
- 117 Vogel, Ch.; Matter, M.: syn-anti Isomerie bei Arylhydrazonen und Arylglyoxylsäuren; *Helvetica Chimica Acta*; 1959, **59**, S. 528-533
- 118 Becker, H., G., O.: *Organikum*; 21. Auflage, Weinheim, Wiley-VCH, 2001
- 119 Oehme, G., Fischer, G., Schellenberger, A.: IR-Spektroskopische Untersuchungen der Stereochemie und Energieübertragung in intramolekularen Wasserstoffbrücken substituierter Phenylglyoxylsäuren; *Chem. Ber.*; 1967, **100**, S. 425-435
- 120 Budesinsky, Z., Sluka, J., Bydzovsky, V.: Antituberkulosni Latky. Isonikotinoylhydrazony nekterych fenylglyoxylovych kyselin; *Cesk. Farm.*; 1964, **13**, S. 345, 347

- 121 Staudinger, H.; Stockmann, H.: Über Einwirkung von Oxalylchlorid auf Dimethylanilin; Chem. Ber.; 1909, **42**, S. 3485
- 122 Tumiatti, V., Recanatini, M., Minarini, A., Melchiorre, C., Chiarini, A., Budriesi, R., Bolognesi, M., L.: Affinity and Selectivity at M₂ and M₃, Muscarinic Receptor Subtypes of Cyclic and Open Oxygenated Analogues of 4-DAMP; IL Farmaco; 1992, **47** (9), S. 1133-1147
- 123 Bockstahler, W.: Some Ethers Derived from Diethylaminoethyl Benzilate; J. Am. Chem. Soc.; 1949, **71**, S. 3760, 3761
- 124 Singh, D.: p-Dimethylaminodiphenylacetic Acid; J. Chem. Soc.; 1925, **127**, S. 2447
- 125 Auterhoff, H., Kovar, K.-A.: Identifizierung von Arzneistoffen; 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1998
- 126 Jork, H., Funk, W., Fischer, W.: Dünnschichtchromatographie, Reagenzien und Nachweismethoden; Band 1a, Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1990
- 127 Cheney, L., C., Bywater, W., G.: 4-Morpholinealkyl Esters and Amides Possessing Antispasmodic Activity; J. Am. Chem. Soc.; 1942, **64**, S. 973

Verzeichnis der verwendeten Substanzbezeichnungen (Teil 2)

47	(<i>R</i>)-/(<i>S</i>)-4-Butoxybenzilsäure
48	(<i>R</i>)-/(<i>S</i>)-4-Dimethylaminobenzilsäure
49	(<i>S</i>)-4-Trifluormethoxybenzilsäure
50	(<i>S</i>)-4-Trifluormethylbenzilsäure
51	(<i>S</i>)-3,5-Dimethoxybenzilsäure
52	(<i>S</i>)-3-Methoxybenzilsäure
53	(<i>R</i>)-/(<i>S</i>)-4-Methylsulfonylbenzilsäure
54	(<i>R</i>)-/(<i>S</i>)-Methyl 4- <i>tert</i> -butylbenzilat
55	(<i>R</i>)-/(<i>S</i>)-Methyl 4- <i>n</i> -butylbenzilat
56	(<i>R</i>)-/(<i>S</i>)-Methyl 4-butoxybenzilat
57	(<i>S</i>)-Methyl 4-dimethylaminobenzilat
58	(<i>S</i>)-Methyl 4-trifluormethoxybenzilat
59	(<i>S</i>)-Methyl 4-trifluormethylbenzilat
60	(<i>S</i>)-Methyl 3,5-dimethoxybenzilat
61	(<i>S</i>)-Methyl 3-methoxybenzilat
62	(<i>R</i>)-/(<i>S</i>)-Methyl 4-methylsulfonylbenzilat
63	(<i>R,S</i>)-Methyl 4- <i>tert</i> -butylbenzilat
64	(<i>R,S</i>)-Methyl 4- <i>n</i> -butylbenzilat
65	(<i>R,S</i>)-Methyl 4-butoxybenzilat
66	(<i>R,S</i>)-Methyl 4-dimethylaminobenzilat
67	(<i>R,S</i>)-Methyl 4-trifluormethoxybenzilat
68	(<i>R,S</i>)-Methyl 4-trifluormethylbenzilat
69	(<i>R,S</i>)-Methyl 3-methoxybenzilat
70	(<i>R,S</i>)-Methyl 4-methylmercaptobenzilat
71	(<i>R,S</i>)-Methyl 4-methylsulfonylbenzilat
72	(<i>R,S</i>)- <i>N</i> -Methyl-4-piperidyl 4- <i>tert</i> -butylbenzilat
73	(<i>R,S</i>)- <i>N</i> -Methyl-4-piperidyl 4- <i>n</i> -butylbenzilat
74	(<i>R,S</i>)- <i>N</i> -Methyl-4-piperidyl 4-butoxybenzilat
75	(<i>R,S</i>)- <i>N</i> -Methyl-4-piperidyl 4-dimethylaminobenzilat
76	(<i>R,S</i>)- <i>N</i> -Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethoxybenzilat
77	(<i>R,S</i>)- <i>N</i> -Methyl-4-piperidyl 4-trifluormethylbenzilat
78	(<i>R,S</i>)- <i>N</i> -Methyl-4-piperidyl 3,5-dimethoxybenzilat
79	(<i>R,S</i>)- <i>N</i> -Methyl-4-piperidyl 3-methoxybenzilat
80	(<i>R,S</i>)-Methyl-4-piperidyl 4-methylsulfonylbenzilat
81	(<i>R,S</i>)- <i>N</i> -Methyl-4-piperidyl 3-trifluormethoxybenzilat
82	(-)-Menthyl (<i>R,S</i>)-4-dimethylaminobenzilat
83	(-)-Menthyl (<i>R,S</i>)-4-trifluormethoxybenzilat
84	(-)-Menthyl (<i>R,S</i>)-3-methoxybenzilat
85	(-)-Menthyl (<i>R,S</i>)-3,4-dimethoxybenzilat
86	(-)-Menthyl (<i>R,S</i>)-4-methylsulfonylbenzilat
87	(-)-Menthyl (<i>R,S</i>)-4- <i>tert</i> -butylbenzilat
88	(<i>R,S</i>)- <i>N</i> -Methyl-4-piperidyl <i>O</i> -acetoxymethyl-3-methoxybenzilat

Vergleichssubstanzen

89	(<i>R,S</i>)-3-Methoxybenzilsäure
90	(<i>R,S</i>)-3,5-Dimethoxybenzilsäure
91	(<i>R,S</i>)-Methyl 3,5-dimethoxybenzilat
92	(<i>R,S</i>)- <i>N</i> -Methyl-4-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat
93	(<i>R,S</i>)- <i>N</i> -Methyl-4-piperidyl 3,4-dihydroxybenzilat
94	(<i>R,S</i>)- <i>N</i> -Methyl-4-piperidyl 4-methoxybenzilat
95	(<i>R,S</i>)- <i>N</i> -Methyl-3-piperidyl (<i>R,S</i>)-3-methoxybenzilat
96	(<i>R,S</i>)- <i>N</i> -Methyl-3-piperidyl (<i>R,S</i>)-3,5-dimethoxybenzilat

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, im September 2004